

METHODE DE CRIBLAGE DE SUBSTANCES A ACTION THERAPEUTIQUE DANS LE TRAITEMENT  
DES ENCEPHALOPATHIES SUBAIGUES SPONGIFORMES TRANSMISSIBLES

5                   La présente invention est relative à une méthode de criblage de substances, susceptibles d'avoir une action thérapeutique dans le traitement des encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST) ou maladies dites à prions, qui comprend une étape d'isolement de la PrPres, à partir de la rate ; la présente invention est également relative à des procédés d'isolement de la PrPres, particulière-  
10 ment adaptés à ladite méthode de criblage ainsi qu'à leurs applications, notamment dans la détection de la PrPres.

                  Les encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles sont provoquées par des agents transmissibles non conventionnels (ANTC), encore appelés prions, dont la nature précise demeure inconnue à ce jour. Les ESST comprennent  
15 essentiellement la maladie de Creutzfeldt-Jakob, chez l'homme (MCJ ou CJD pour Creutzfeldt-Jakob *disease*), la tremblante, chez le mouton et la chèvre et l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB ou BSE pour *bovine spongiform encephalopathy*), chez les bovins ; d'autres encéphalopathies ont été mises en évidence chez le vison ou certains animaux sauvages, tels que le cerf et l'élan.

20                   Ces maladies sont d'évolution constamment fatale et il n'existe, à l'heure actuelle, aucun traitement efficace.

                  Dans les encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles, il existe une accumulation d'une protéine de l'hôte, la PrP (ou protéine du prion), sous une forme anormale (PrPres), principalement dans le système nerveux central ; la  
25 PrPres copurifie avec l'infectiosité et son accumulation précède l'apparition des lésions histologiques. *In vitro*, elle est toxique pour des cultures de neurones.

                  Deux propriétés biochimiques permettent de distinguer la PrPres de la PrP normale : la PrPres est partiellement résistante aux protéases et est insoluble dans les détergents non-ioniques, tels que le Triton-X100.

30                   La recherche de nouvelles molécules susceptibles d'être efficaces dans le traitement de ces encéphalopathies se heurte à l'absence aussi bien de modèles *in vitro* performants, qu'à la longueur de la mise en place des modèles expérimentaux

*in vivo*, tels que la tremblante expérimentale du hamster (80 à 365 jours) ou la tremblante expérimentale de la souris (180 à 550 jours).

En conséquence, les Inventeurs se sont donné pour but de pourvoir à une méthode de criblage efficace et fiable, qui ne présente pas les inconvénients des modèles expérimentaux actuellement utilisés et qui répond mieux aux besoins de la pratique, notamment en ce que l'évaluation de l'action des substances à tester peut être réalisée en moins de deux mois.

Pour ce faire, les Inventeurs ont trouvé un marqueur fiable et ont mis au point un protocole reproductible.

La présente invention a pour objet une méthode de criblage de substances, susceptibles d'avoir une action thérapeutique dans le traitement des encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST ou maladies dites à prions), caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

a) inoculation au moment  $t_A$ , à au moins un animal de laboratoire tel qu'un rongeur, souris ou hamster (de préférence plusieurs, répartis en lots), par toute voie appropriée, d'un agent transmissible non conventionnel (ATNC) ou prion ;

b) administration audit animal de laboratoire, par toute voie appropriée, soit d'une substance à cribler (animal test), soit d'un placebo (animal contrôle négatif), dans un délai compris entre  $t_A - 15$  jours et  $t_C$ , correspondant au moment où le taux de PrPres dans la rate dudit animal de laboratoire est maximal ou dans un délai compris entre  $t_B$ , correspondant au moment de la première détection de PrPres dans la rate dudit animal de laboratoire et  $t_C$  ;  $t_B$  étant compris entre  $t_A$  et  $t_A + 15$  et  $t_C$  étant compris entre  $t_A + 20$  et  $t_A + 30$ , de préférence entre  $t_A + 25$  et  $t_A + 30$  ;

c) sacrifice des animaux dans un intervalle de temps compris entre  $t_B$  et  $t_C$ , de préférence à  $t_C$  et prélèvement de la rate ;

d) isolement de la PrPres à partir des rates prélevées, selon un procédé d'isolement convenable comprenant l'homogénéisation de la rate, suivie d'une extraction spécifique de la PrPres comprenant une seule étape de séparation, à partir de l'homogénat obtenu et éventuellement la purification de la PrPres ;

e) semi-quantification de la PrPres obtenue à l'étape (d) par détection de ladite PrPres par toute méthode appropriée, produisant un signal spécifique, suivie d'une comparaison du signal obtenu avec une gamme étalon de dilutions d'un contrôle

positif constitué d'un homogénat de cerveau d'un animal au stade terminal de la maladie ; et

f) sélection de la substance criblée comme candidat au traitement des encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles, si le taux de PrPres obtenu dans la rate de l'animal test, à l'étape e) est diminué d'au moins un facteur 2, par rapport au taux obtenu dans les mêmes conditions avec l'animal contrôle négatif.

Les temps  $t_A$ ,  $t_B$  et  $t_C$  sont exprimés en jours ;  $t_A = J0$ .

En effet, les Inventeurs ont trouvé, de manière inattendue, que les substances qui augmentent la survie d'animaux infectés, quelle que soit la voie d'inoculation (périphérique ou intracérébrale), entraînent également un retard dans l'accumulation de la PrPres au niveau de la rate, détectée dans des conditions standardisées.

On entend par conditions standardisées, au sens de la présente invention, des conditions dans lesquelles les paramètres suivants sont sélectionnés :

- ATNC sélectionné,
- voie d'administration de l'ATNC,
- méthode d'isolement de la PrPres à partir de la rate.

Pour une souche sélectionnée dans un animal donné, au stade terminal de la maladie, le titre infectieux est constant.

La détection de la PrPres dans la rate permet d'observer beaucoup plus rapidement les effets des molécules à tester, en particulier l'inhibition de l'accumulation de la PrPres, soit dans les heures qui suivent l'inoculation (capture de l'inoculum par la rate et détection d'un pic de PrPres, entre  $t_A$  et  $t_A + 1-2$  jours), soit entre 5 et 15 jours après l'infection ;  $t_B$  correspond aussi bien à la détection du pic au moment de la capture de l'inoculum qu'à la détection de la PrPres néosynthétisée ; c'est la raison pour laquelle  $t_B$  est compris entre  $t_A$  et  $t_A + 15$  ; ces valeurs de  $t_B$  et de  $t_C$  peuvent varier dans les fourchettes définies ci-dessus, en fonction de l'ATNC et de l'animal de laboratoire (souris) sélectionnés ; par exemple, lorsque l'ATNC correspond à la souche murine C506M3 inoculée par voie intrapéritonéale, chez la souris C57BL/6, la PrPres néosynthétisée peut être détectée dans 100 % des cas, dès le 5<sup>ème</sup> jour post-infection (p.i.) ( $t_B$ ) et un plateau est observé à partir du 30<sup>ème</sup> jour p.i. ( $t_C$ ).

Une telle méthode permet donc de sélectionner des molécules capables d'empêcher l'accumulation de PrPres ; de telles molécules sont considérées comme pouvant présenter une action thérapeutique dans le traitement des ESST.

Conformément à l'invention :

**\* à l'étape a) :**

- l'ATNC correspond à une souche stabilisée chez l'animal hôte, c'est-à-dire qui présente des caractéristiques stables chez cet animal hôte après plusieurs passages et notamment les caractéristiques suivantes : délai d'apparition de la maladie identique et profil lésionnel identique au cours des passages chez tous les animaux (degré de vacuolisation de différentes parties du cerveau) ; il correspond à n'importe quelle souche stabilisée dans les conditions précisées ci-dessus, induisant une accumulation précoce de PrPres dans la rate de l'animal hôte, telle que des souches de tremblante ou des souches d'encéphalopathie bovine, notamment les souches de tremblante dénommées Chandler, ME7, 139A (M.E. Bruce et al., *Scrapie strain variation and its implication* dans *Current topics in Microbiology and Immunology: Transmissible Spongiform Encephalopathies, Scrapie, BSE and related Disorders*, 1991, 172, 125-138), C506M3 (C.I. Lasmézas et al., *J. Gen. Virol.*, 1996, 77, 1601-1609) ou 263K (R.H. Kimberlin et al., *J. Gen. Virol.*, 1977, 34, 295-304 et 1978, 39, 487-496) ou les souches de BSE dénommées 4PB1 (C.I. Lasmézas et al., 1996, précité) et 301V (C.F. Farquhar et al., *J. Gen. Virol.*, 1996, 77, 1941-1946) ;

- ledit ATNC est, de préférence administré dans un tampon adapté à la voie d'administration sélectionnée, sous la forme soit d'un homogénat brut de tissu, de préférence de cerveau, soit d'un culot de PrPres, obtenu par centrifugation convenable, à partir d'un homogénat brut de tissu, de préférence de cerveau ;

- ledit ATNC peut être administré par n'importe quelle voie (voie orale, voie parentérale), de préférence par voie intrapéritonéale, à une dose correspondant à un inoculum d'ATNC, compris entre 0,001 % et 10 % (poids/volume) ( $DL_{50}$  comprise entre  $10^3$  et  $10^7$ ) ;

- ledit animal de laboratoire est de préférence un rongeur (souris ou hamster, par exemple).

**\* à l'étape b) :**

- la substance à cribler est administrée par voie orale ou parentérale ;



- si le traitement est commencé entre  $t_B$  et  $t_C$ , (c'est-à-dire lorsque la PrPres dans la rate est constamment détectable), le modèle selon l'invention permet d'étudier uniquement l'action de la substance à cribler sur l'ATNC inoculé en cours de répliation au niveau des sites de répliation (cellules cibles), alors que si elle est administrée avant  $t_B$ , par exemple à  $t_A$ , le modèle selon l'invention permet d'étudier en plus l'action de la substance à cribler, avant que l'ATNC n'ait atteint ses cellules cibles dans la rate.

**\* à l'étape d) :**

- selon la séquence d'étapes sélectionnées parmi les techniques d'isolement des protéines connues, à savoir les méthodes basées sur la taille moléculaire, telle que la centrifugation, les méthodes basées sur les différences de solubilité telles que la dissolution par les sels (*salting-in*) et le relargage (*salting-out*) ou le fractionnement par des solvants ou les méthodes basées sur la charge électrique, le degré de purification et le rendement seront différents. Dans le cadre de la présente invention, il est nécessaire de sélectionner une méthode fiable et sensible, permettant d'obtenir un seuil de détection tel que le rapport taux maximal détectable dans la rate/valeur seuil (*cut off*) soit le plus élevé possible, de préférence supérieur à 2 ou tel que lorsqu'on l'on réalise une dilution au  $\frac{1}{2}$  de l'échantillon final obtenu, on obtient encore un signal de détection ;

- des séquences d'étapes préférées sont décrites ci-après : elles ont l'avantage, sur les procédés d'isolement antérieurement décrits, de présenter une grande fiabilité et une grande sensibilité, du fait que l'extraction proprement dite ne comprend qu'une seule étape de séparation et du fait de la sélection particulière de la séquence d'étapes, alors que dans les procédés antérieurement décrits (R.E. Race et al., J. Gen. Virol., 1992, 73, 3319-3323 ; Doi et al., J. Gen. Virol., 1988, 69, 955-960 ; T. Muramoto et al., Am. J. Pathol., 1993, 143, 5 1470-1479 ; Farquhar C.F. et al., Gen. Virol., 1994, 75, 495-504 et J. Gen. Virol., 1996, 77, 1941-1946), l'extraction comprend plusieurs étapes de séparation et conduit à une imprécision pour ce qui concerne la quantification et/ou ces procédés présentent une sensibilité insuffisante pour obtenir un seuil de détection et une quantification fines et notamment pour effectivement détecter une variation importante du taux de PrPres.

\* à l'étape e) :

- la PrPres est notamment détectée par immunoessai (Western blot par exemple).

La présente invention a également pour objet un procédé d'isolement de la PrPres, à partir d'un organe ou d'un tissu, notamment la rate ou le cerveau, caractérisé en ce qu'il comprend essentiellement les étapes suivantes :

(i) homogénéisation d'organe ou de tissu, prélevés après le sacrifice de l'animal, par broyage mécanique dans un tampon d'homogénéisation, suivi d'un calibrage de l'homogénat, pour l'obtention d'un homogénat comprenant, en poids/volume, de 5 à 50 % dudit organe ou tissu ;

(ii) extraction spécifique de la PrPres comprenant une seule étape de séparation, par traitement de l'homogénat obtenu à l'étape (i) par incubation de la suspension obtenue avec une protéase et un détergent (agent surfactif) anionique, apte à favoriser l'agrégation de la PrPres, tel que du sarkosyl (lauroyl sarcosine) à 10-30 % dans un tampon convenable et séparation de la PrPres, par ultracentrifugation unique à 480 000-1 200 000 g.h, de préférence pendant 2-4 heures, par exemple à 240 000-300 000 g pendant 2 à 4 h, de préférence à 20-22°C, de la suspension obtenue, déposée sur un coussin de tampon ayant une densité comprise entre 1,02 et 1,08, à 20°C et récupération du culot de centrifugation comprenant ladite PrPres ; et, si nécessaire,

(iii) purification de la PrPres par mise en suspension du culot de centrifugation obtenu en (ii) dans un tampon de Laemmli comprenant du SDS à 1-5 %, incubation dans ce tampon à 100°C pendant 2-10 minutes et centrifugation à 12 000-15 000 g pendant 10-15 minutes à 16-22°C.

Ladite PrPres ainsi purifiée peut ensuite être séparée par toute technique appropriée telle qu'une électrophorèse (électrophorèse sur gel de polyacrylamide, par exemple) ou une immunocapture, à partir du surnageant de centrifugation.

Conformément à ce procédé, le tampon d'homogénéisation de l'étape (i) est notamment un tampon neutre tel que de l'eau ou un tampon isotonique tel que du glucose à 5%.

Également conformément à l'invention, lors de l'étape (ii) d'extraction, l'ultracentrifugation est réalisée après dépôt de la suspension contenant la PrPres sur un coussin de saccharose à 6-20 %.

En variante, la présente invention a également pour objet un procédé, dans lequel l'extraction comprend une seule étape pour la séparation de la PrPres, et ne nécessite pas d'ultracentrifugation ; un tel procédé d'isolement de la PrPres, à partir d'un organe ou d'un tissu, notamment la rate ou le cerveau est caractérisé en ce qu'il comprend essentiellement les étapes suivantes :

(i) homogénéisation d'organe ou de tissu, prélevés après le sacrifice de l'animal, par broyage mécanique dans un tampon d'homogénéisation, puis addition à l'homogénat obtenu, d'un sel ayant une force ionique élevée et apte à favoriser l'agrégation de la PrPres, tel que du NaCl à 10-30 %, dans un rapport 1:1 (v/v), suivi d'un calibrage de l'homogénat, pour l'obtention d'un homogénat comprenant, en poids/volume, de 5 à 50 % dudit organe ou tissu ;

(ii) extraction spécifique de la PrPres par traitement de l'homogénat obtenu à l'étape (i) par incubation de la suspension obtenue avec une protéase et un détergent anionique apte à favoriser l'agrégation de la PrPres, tel que du sarkosyl à 10-30 % et séparation unique de la PrPres, par centrifugation à 25 000-60 000 g.h, par exemple à 25 000-30 000 g pendant 1-2 heures, de préférence à 16-22°C, de la suspension obtenue, déposée sur un coussin de tampon ayant une densité comprise entre 1,02 et 1,08, à 20°C et récupération du culot de centrifugation comprenant ladite PrPres ; et, si nécessaire

(iii) purification de la PrPres par mise en suspension du culot de centrifugation obtenu en (ii) dans un tampon de Laemmli comprenant du SDS à 1-5 %, incubation dans ce tampon à 100°C pendant 2-10 minutes et centrifugation à 12 000-15 000 g pendant 10-15 minutes à 16-22°C.

Ladite PrPres ainsi purifiée peut ensuite être séparée par toute technique appropriée telle qu'une électrophorèse (électrophorèse sur gel de polyacrylamide, par exemple) ou une immunocapture, à partir du surnageant de centrifugation.

Conformément à ce procédé, le tampon d'homogénéisation de l'étape (i) est notamment un tampon neutre tel que de l'eau ou un tampon isotonique tel que du glucose à 5% ;

Également conformément à l'invention :

5 lors de l'étape (ii) d'extraction, la solution mise en œuvre pour l'extraction comprend un détergent anionique, apte à favoriser l'agrégation de la PrPres et un détergent ayant des propriétés de renaturation des protéines, tel qu'un détergent zwitterionique, comme une sulfobétaïne, de préférence la sulfobétaïne SB 3-14 à 1-2 %, dans un rapport 1:1 (v/v) ;

10 lors de l'étape (ii) d'extraction, mais préalablement à la centrifugation, au moins un inhibiteur des protéases est ajouté ;

la centrifugation selon l'étape (ii) d'extraction est, de préférence, réalisée après dépôt de la suspension contenant la PrPres sur un coussin de saccharose à 6-20 % ou un coussin de saccharose à 6-20 % et d'une sulfobétaïne.

15 La PrPres peut ensuite être détectée par toute méthode spécifique appropriée.

De manière surprenante, ces procédés d'isolement de la PrPres, à partir de la rate, comprenant une extraction en une seule étape, n'entraînent pas de perte cumulative de PrPres et sont directement utilisables sans modification, pour  
20 extraire la PrPres de n'importe quel autre tissu.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

25 - la figure 1 illustre le protocole mis en œuvre dans une méthode de criblage selon l'invention ;

- la figure 2 représente un gel de polyacrylamide montrant l'inhibition de l'accumulation de la PrPres dans les rates de souris infectées par la souche C506M3 et traitées par l'amphotéricine B (AmB) (l'échelle des poids moléculaires a été établie  
30 avec des marqueurs précolorés Amersham) ;

- la figure 3, sous la forme d'un histogramme, illustre l'inhibition de l'accumulation de la PrPres, chez la même souris, après traitement par l'amphotéricine

B ou l'ABLC® (*AmB Lipid Complex*), par rapport à un animal contrôle négatif, traité par un placebo et dans lequel il n'y a pas d'inhibition de ladite accumulation ;

- les figures 4 et 5 illustrent la cinétique d'accumulation de la PrPres dans la rate de souris C57BL/6 inoculées i.p. par la souche C506M3 (0-28 jours post-inoculation) ;

- la figure 6 illustre le rôle de la composition du tampon d'extraction, dans le rendement de purification de la PrPres ;

- la figure 7 illustre le protocole de traitement mis en œuvre pour tester le sulfate de dextran (DS500) ;

- la figure 8 illustre l'accumulation de la PrPres dans des rates de souris C57BL/6, infectées par voie intrapéritonéale, par la souche C506M3 et traitées 2h avant l'inoculation par le sulfate de dextran DS500.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

**EXEMPLE 1 : Étude de l'accumulation de la PrPres dans des rates de souris C57BL/6, infectées par voie intrapéritonéale (ip) par la souche C506M3 et traitées pendant 1 ou 2 semaines (6 jours/semaine), à partir de  $t_A+15$  après l'inoculation, par l'amphotéricine B (AmB) et ses dérivés ; isolement de la PrPres présente dans la rate par le procédé d'isolement comportant une ultracentrifugation, tel que décrit ci-dessus.**

étape a) de la méthode de criblage : inoculation

à  $t_A$ , des souris C57BL/6 sont inoculées par voie intrapéritonéale avec 100  $\mu$ l d'homogénat de cerveau à 2 % dans du glucosé 5 %, d'une souris infectée au stade terminal de la tremblante expérimentale (souche C506M3).

étape b) de la méthode de criblage : administration d'une substance susceptible d'avoir une action thérapeutique ou administration d'un placebo

à  $t_A+15$  jours ( $\rightarrow$  délai compris entre  $t_B$  et  $t_C$ ), les souris C57BL/6 sont réparties en différents lots et sont traitées :

- soit avec de l'amphotéricine B, à raison de 1 mg/kg (AmB),  
- soit avec de l'ABLC®, à raison de 10 mg/kg, pendant 6 jours (1) ou 12 jours (2), conformément à la figure 1,

- soit avec un placebo.

étape c) de la méthode de criblage : sacrifice des animaux.

À  $t_A+21$  jours ( $\rightarrow$  délai compris entre  $t_B$  et  $t_C$ ) ou à  $t_A+28$  jours ( $\rightarrow$  à  $t_C$ ), les souris sont sacrifiées par rupture des vertèbres cervicales ; les rates sont immédiatement prélevées, conformément à la figure 1, et soit stockées à  $-80^\circ\text{C}$ , soit utilisées extemporanément.

étape d) de la méthode de criblage : isolement de la PrPres

Les rates prélevées sont broyées et homogénéisées à 10 % (poids/volume) dans une solution de glucose à 5 %. L'homogénat obtenu est calibré, par passage dans une seringue convenable.

L'homogénat à 10 % (200  $\mu\text{l}$ ) est ensuite traité à la protéinase K (10  $\mu\text{g/ml}$ ), à  $37^\circ\text{C}$ , pendant une heure ; la digestion est bloquée à l'aide de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) 5 mM. Après addition de sarkosyl à 20 % dans du Tris pH 7,4 10 mM, les échantillons sont incubés pendant 15 minutes à température ambiante. Ils sont ensuite centrifugés à 245 000 g pendant 4 heures à  $20^\circ\text{C}$ , sur un coussin de saccharose à 10 % (100-300  $\mu\text{l}$ ) (ultracentrifugeuse Beckman TL100).

Les culots sont remis en suspension dans un tampon de Laemmli, incubés 5 minutes à  $100^\circ\text{C}$ , puis les échantillons obtenus sont soumis à une centrifugation à 15 000 g, pendant 15 minutes à  $16^\circ\text{C}$ .

étape e) de la méthode de criblage selon l'invention : détection de la PrPres dans les échantillons.

Les échantillons obtenus sont utilisés pour réaliser une électrophorèse SDS-PAGE (gel de polyacrylamide à 12 % chargé avec l'équivalent de 10 mg de rate) et transféré sur membrane de nitrocellulose, dans les conditions décrites par Towbin et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 4350-4354) ou par C.I. Lasmézas et al. (J. Gen. Virol., 1996, précité). L'immunodétection de la PrPres a été réalisée avec l'antisérum 007 JB (R. Demaimay et al., Journal of Virology, 1997, 71, 12, 9685-9689), dirigé contre le peptide 90-108 de la PrP murine au 1/2500) et des Ig de chèvre anti-lapin conjuguées à de la peroxydase (1/2500). L'immunoréactivité est révélée par chimioluminescence (ECL, Amersham), quantifiée et visualisée sur films autoradiographiques, comme illustré sur la figure 2, pour les animaux non traités et les

animaux traités pendant 6 jours par l'AmB à 1 mg/kg et sacrifiés à  $t_A+28$  jours, c'est-à-dire une semaine après la fin du traitement.

Les anticorps sont obtenus par couplage dudit peptide (Néosystem, Strasbourg) à la KLH, puis injection sous-cutanée dans la région dorsale de lapins « Nouvelle-Zélande » d'une émulsion comprenant ledit peptide couplé et de l'adjuvant complet de Freund (R. Demaimay et al., Journal of Virology, 1997, 71, 12, 9685-9689).

\* étape f) de la méthode de criblage selon l'invention : sélection de la substance criblée

La figure 3 illustre les résultats obtenus pour les animaux non traités, les animaux traités par l'AmB, 1 mg/kg sacrifiés à  $t_A+21$  ou à  $t_A+28$  et les animaux traités par l'ABLC® 6 jours (1) ou 12 jours (2) et sacrifiés à  $t_A+21$  ou à  $t_A+28$  : aussi bien pour les animaux traités par l'AmB que par l'ABLC®, on observe une inhibition significative de l'accumulation de PrPres ; pour construire l'histogramme, les quantités de PrPres détectées dans la rate sont rapportées à une gamme linéaire de dilutions de PrPres purifiée selon le même procédé que celui décrit ci-dessus, à partir d'un homogenat de cerveau d'animaux au stade terminal de la maladie (contrôle positif).

Les figures 4 et 5 illustrent la cinétique d'accumulation de la PrPres dans la rate de souris C57BL/6, inoculées par la souche C506M3 à  $t_A$ , dans les mêmes conditions que ci-dessus, pendant 28 jours et non traitées : on observe une augmentation progressive jusqu'à  $t_A+30$  ( $\rightarrow$  à  $t_C$ ) ; un plateau est observé à partir de  $t_A+30$ .

**EXEMPLE 2 : Étude de l'accumulation de la PrPres dans des rates de souris C57BL/6, infectées par voie intrapéritonéale (ip) par la souche C506M3 et traitées pendant 1 ou 2 semaines (6 jours/semaine), à partir de  $t_A+15$  après l'inoculation, par l'amphotéricine B (AmB) et ses dérivés ; isolement de la PrPres par le procédé ne comportant pas d'ultracentrifugation.**

Les étapes a), b), c), e) et f) sont identiques à celles de l'exemple 1.

L'étape d) d'isolement de la PrPres à partir des rates de souris est réalisée comme suit :

Les rates prélevées sont broyées et homogénéisées à 20 % (poids/volume) dans une solution contenant du glucose à 5 % ; on ajoute à 200  $\mu$ l

d'homogénat, 200 µl de NaCl à 20 % (1:1, v/v). L'homogénat obtenu est calibré, par passage dans une seringue convenable.

On ajoute à 200 µl d'homogénat à 20 %, 200 µl de détergent (sarkosyl à 20 % et sulfobétaïne à 2 % (SB3.14 Calbiochem)) et de la protéinase K à 10 µg/ml, puis on incube à 37°C, pendant une heure.

Les échantillons sont ensuite centrifugés à 30 000 g pendant 2 heures à 22°C, sur 200 µl d'un coussin comprenant du saccharose à 10 % et de la sulfobétaïne à 0,1 %, en concentrations finales (rotor Eppendorf ; centrifugeuse ALC 4239R).

La figure 6 illustre les rendements de purification obtenus avec différentes compositions de tampons d'extraction (représentation sous la forme d'un histogramme et d'un Western blot) : 1 : témoin de rendement (homogénat total) ; 2 : sarkosyl à 10 %/NaCl à 10 %/Tris 10 mM/SB3-14 à 1 % ; 3 : sarkosyl à 10 %/NaCl à 10 %/Tris 10 mM ; 4 : sarkosyl à 10 %/NaCl à 10 % ; 5 : sarkosyl à 10 %.

Les culots sont remis en suspension dans un tampon de Laemmli, incubés 5 minutes à 100°C, puis les échantillons obtenus sont soumis à une deuxième centrifugation à 15 000 g, pendant 15 minutes à 16°C.

**EXEMPLE 3 : Étude de l'accumulation de la PrPres dans des rates de souris C57BL/6 infectées par voie intrapéritonéale par la souche C506M3 et traités à  $t_A$ -2 heures par le sulfate de dextran (DS500).**

Le protocole de traitement est résumé à la figure 7.

étape b) de la méthode de criblage : administration d'une substance susceptible d'avoir une action thérapeutique

A  $t_A$ -2 heures (c'est-à-dire 2 heures avant l'inoculation de la souche infectante), des souris C57BL/6 sont réparties en différents lots :

- souris non traitées
- et souris traitées avec du sulfate de dextran (DS500) à 25 mg/kg (injection unique à  $t_A$ -2 heures).

étape a) de la méthode de criblage : inoculation

à  $t_A$ , les souris C57BL/6 sont inoculées par voie intrapéritonéale avec 100 µl d'homogénat de cerveau à 2 % dans du glucosé 5 %, d'une souris infectée au stade terminal de la tremblante expérimentale [souche C506M3].



étape c) de la méthode de criblage : sacrifice des animaux.

À  $t_A + 2$  heures,  $t_A + 7$  jours et  $t_A + 22$  jours, les souris sont sacrifiées par rupture des vertèbres cervicales ; les rates sont immédiatement prélevées.

étape d) de la méthode de criblage : isolement de la PrPres  
identique à l'étape d) de l'exemple 2.

étape e) de la méthode de criblage selon l'invention : détection de la PrPres dans les échantillons.

Les échantillons obtenus sont utilisés pour réaliser une électrophorèse SDS-PAGE (gel de polyacrylamide à 12 % chargé avec l'équivalent de 40 mg de rate pour 2 h et 7 jours et de 10 mg de rate pour 22 jours) et transféré sur membrane de nitrocellulose, dans les conditions décrites par Towbin et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 4350-4354) ou par C.I. Lasmézas et al. (J. Gen. Virol., 1996, précité). L'immunodétection de la PrPres a été réalisée avec l'antisérum 007JB (R. Demaimay et al., J. Virol, 1997, 71, 12, 9685-9689) au  $1/5\ 000^{ème}$ , et des Ig de chèvre anti-lapin conjuguées à de la peroxydase (1/2500). L'immunoréactivité est révélée par chimio-luminescence (ECL, Amersham), quantifiée et visualisée sur films autoradiographiques, comme illustré sur la figure 8, pour les animaux non traités et les animaux traités 2 h avant l'inoculation par le DS500 et sacrifiés à  $t_A + 2$  h,  $t_A + 7$  jours et  $t_A + 22$  jours.

\* étape f) de la méthode de criblage selon l'invention : sélection de la substance criblée

La figure 8 illustre les résultats obtenus ; on observe une inhibition significative de l'accumulation de PrPres, chez les animaux traités.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée de la présente invention.

### REVENDEICATIONS

1°) Méthode de criblage de substances, susceptibles d'avoir une action thérapeutique dans le traitement des encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST), caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

5 a) inoculation au moment  $t_A$ , à au moins un animal de laboratoire sélectionné dans le groupe constitué par les rongeurs, par toute voie appropriée, d'un agent transmissible non conventionnel (ATNC) ;

b) administration audit animal de laboratoire, par toute voie appropriée, soit d'une substance à cribler (animal test), soit d'un placebo (animal contrôle négatif), dans un délai compris entre  $t_A - 15$  jours et  $t_C$ , correspondant au moment où le 10 taux de PrPres dans la rate dudit animal de laboratoire est maximal ou dans un délai compris entre  $t_B$ , correspondant au moment de la première détection de PrPres dans la rate dudit animal de laboratoire et  $t_C$  ;  $t_B$  étant compris entre  $t_A$  et  $t_A + 15$  et  $t_C$  étant compris entre  $t_A + 25$  et  $t_A + 30$  ;

15 c) sacrifice des animaux dans un intervalle de temps compris entre  $t_B$  et  $t_C$ , de préférence à  $t_C$  et prélèvement de la rate,  $t_A$ ,  $t_B$  et  $t_C$  étant exprimés en jours ;

d) isolement de la PrPres à partir de chaque rate prélevée selon un procédé d'isolement convenable comprenant l'homogénéisation de la rate, suivie d'une extraction spécifique de la PrPres comprenant une seule étape de séparation, à partir de 20 l'homogénat obtenu et éventuellement la purification de la PrPres ;

e) semi-quantification de la PrPres obtenue à l'étape (d) par détection de ladite PrPres par toute méthode appropriée, produisant un signal spécifique, suivie d'une comparaison du signal obtenu avec une gamme étalon de dilutions d'un contrôle positif constitué d'un homogénat de cerveau d'un animal au stade terminal de la mala- 25 die ; et

f) sélection de la substance criblée comme candidat au traitement des encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles, si le taux de PrPres obtenu dans la rate de l'animal test, à l'étape e) est diminué d'au moins un facteur 2, par rapport au taux obtenu dans les mêmes conditions avec l'animal contrôle négatif.

30 2°) Méthode de criblage selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'à l'étape a), ledit ATNC est, de préférence administré dans un tampon adapté à la voie d'administration sélectionnée, sous la forme soit d'un homogénat brut de tissu, de

préférence de cerveau, soit d'un culot de PrPres, obtenu par centrifugation convenable, à partir d'un homogénat brut de tissu, de préférence de cerveau.

3°) Méthode de criblage selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce qu'à l'étape a), ledit ATNC est administré par voie intrapéritonéale, à une dose correspondant à un inoculum d'ATNC, compris entre 0,001 % et 10 % (poids/volume) ( $DL_{50}$  comprise entre  $10^3$  et  $10^7$ ).

4°) Méthode de criblage selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'à l'étape d), ladite méthode d'isolement est sélectionnée de telle sorte que le rapport taux maximal détectable dans la rate/valeur seuil (*cut off*) est supérieur à 2 ou qu'une dilution au 1/2 de l'échantillon final obtenu fournit toujours un signal de détection.

5°) Méthode de criblage selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'à l'étape d), ladite méthode d'isolement de la PrPres comprend une séparation en une seule étape.

6°) Méthode de criblage selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'à l'étape e), la PrPres est détectée par immunoessai.

7°) Procédé d'isolement de la PrPres, à partir d'un organe ou d'un tissu, notamment la rate ou le cerveau, apte à être mis en œuvre dans une méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend essentiellement les étapes suivantes :

(i) homogénéisation d'organe ou de tissu, prélevés après le sacrifice de l'animal, par broyage mécanique dans un tampon d'homogénéisation, suivi d'un calibrage de l'homogénat, pour l'obtention d'un homogénat comprenant, en poids/volume, de 5 à 50 % dudit organe ou tissu ;

(ii) extraction spécifique de la PrPres comprenant une seule étape de séparation, par traitement de l'homogénat obtenu à l'étape (i) par incubation de la suspension obtenue avec une protéase et un détergent anionique apte à favoriser l'agrégation de la PrPres dans un tampon convenable et séparation de la PrPres, à partir de la suspension ainsi obtenue, par ultracentrifugation unique à 480 000-1 200 000 g.h, de préférence pendant 2-4 heures, par exemple à 240 000-300 000 g pendant 2 à 4 h, de préférence à 20-22°C, de ladite suspension, déposée sur un coussin

de tampon ayant une densité comprise entre 1,02 et 1,08, à 20°C et récupération du culot de centrifugation comprenant ladite PrPres ; et, si nécessaire,

(iii) purification de la PrPres par mise en suspension du culot de centrifugation obtenu en (ii) dans un tampon de Laemmli comprenant du SDS à 1-5 %, incubation dans ce tampon à 100°C pendant 2-10 minutes et centrifugation à 12 000-15 000 g pendant 10-15 minutes à 16-22°C.

8°) Procédé d'isolement de la PrPres, à partir d'un organe ou d'un tissu, notamment la rate ou le cerveau, apte à être mis en œuvre dans une méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend essentiellement les étapes suivantes :

(i) homogénéisation d'organe ou de tissu, prélevés après le sacrifice de l'animal, par broyage mécanique dans un tampon d'homogénéisation, puis addition à l'homogénat obtenu, d'un sel ayant une force ionique élevée et apte à favoriser l'agrégation de la PrPres, dans un rapport 1:1 (v/v), suivi d'un calibrage de l'homogénat, pour l'obtention d'un homogénat comprenant, en poids/volume, de 5 à 50 % dudit organe ou tissu ;

(ii) extraction spécifique de la PrPres par traitement de l'homogénat obtenu à l'étape (i) par incubation de la suspension obtenue avec solution comprenant une protéase et un détergent anionique apte à favoriser l'agrégation de la PrPres et séparation unique de la PrPres, par centrifugation à 25 000-60 000 g.h, par exemple à 25 000-30 000 g pendant 1-2 heures, de préférence à 16-22°C, de la suspension obtenue, déposée sur un coussin de tampon ayant une densité comprise entre 1,02 et 1,08, à 20°C et récupération du culot de centrifugation comprenant ladite PrPres ; et, si nécessaire

(iii) purification de la PrPres par mise en suspension du culot de centrifugation obtenu en (ii) dans un tampon de Laemmli comprenant du SDS à 1-5 %, incubation dans ce tampon à 100°C pendant 2-10 minutes et centrifugation à 12 000-15 000 g pendant 10-15 minutes à 16-22°C.

9°) Procédé selon la revendication 7 ou la revendication 8, caractérisé en ce que le tampon d'homogénéisation de l'étape (i) est notamment un tampon neutre tel que de l'eau ou un tampon isotonique tel que du glucose à 5%.

10°) Procédé selon la revendication 7 ou la revendication 8, caractérisé en ce qu'à l'étape (ii), préalablement à la centrifugation, au moins un inhibiteur des protéases est ajouté.

11°) Procédé selon la revendication 7 ou la revendication 8, caractérisé en ce qu'à l'étape (ii), la centrifugation est, de préférence, réalisée après dépôt de la suspension contenant la PrPres sur un coussin de saccharose à 6-20 %.

12°) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que lors de l'étape (ii) d'extraction la solution mise en œuvre pour l'extraction comprend un détergent anionique apte à favoriser l'agrégation de la PrPres et un détergent zwitterionique, tel qu'une sulfobétaïne, de préférence la sulfobétaïne SB 3-14 à 1-2 %, dans un rapport 1:1 (v/v).

13°) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'à l'étape (ii) d'extraction, la centrifugation est, de préférence, réalisée après dépôt de la suspension contenant la PrPres, sur un coussin comprenant en mélange du saccharose à 6-20 % et une sulfobétaïne.

14°) Application d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 13 à la détection de la PrPres dans un organe ou un tissu.



1/6

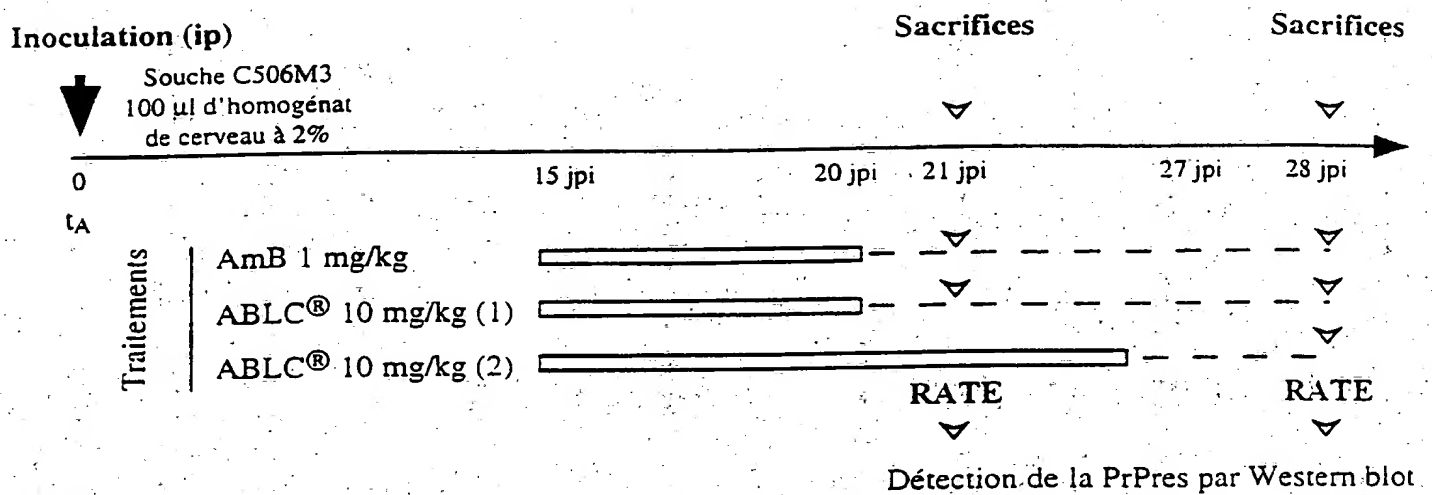


FIGURE 1

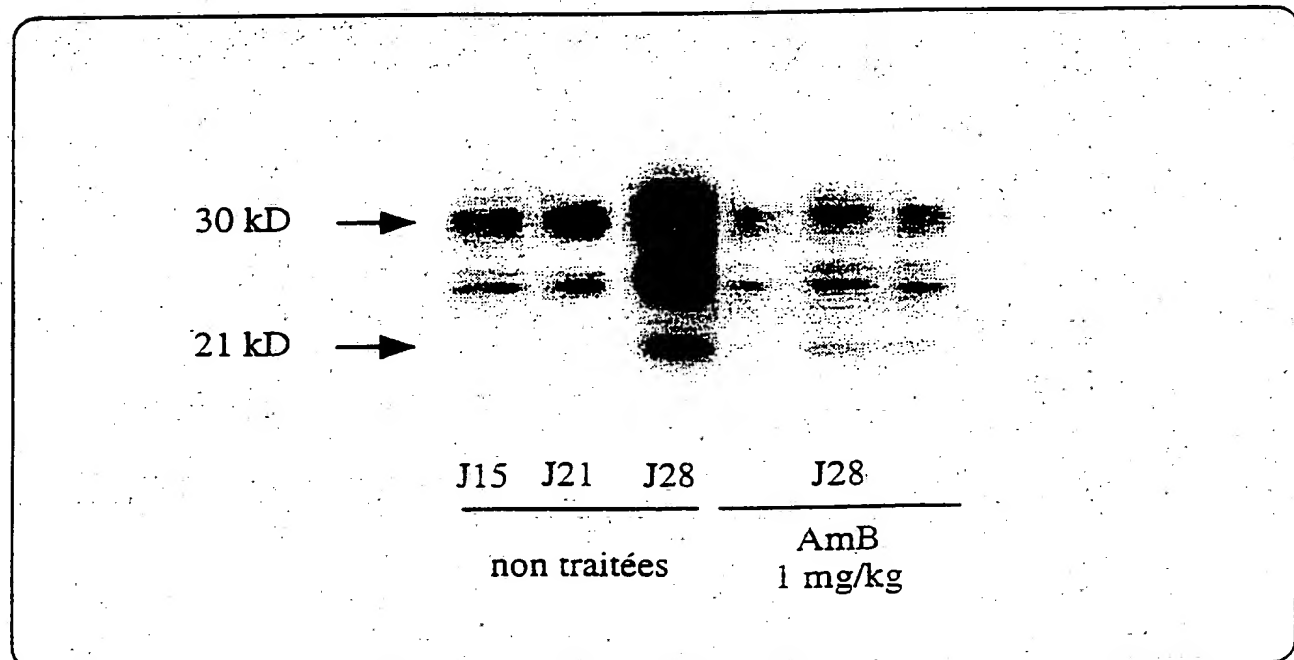
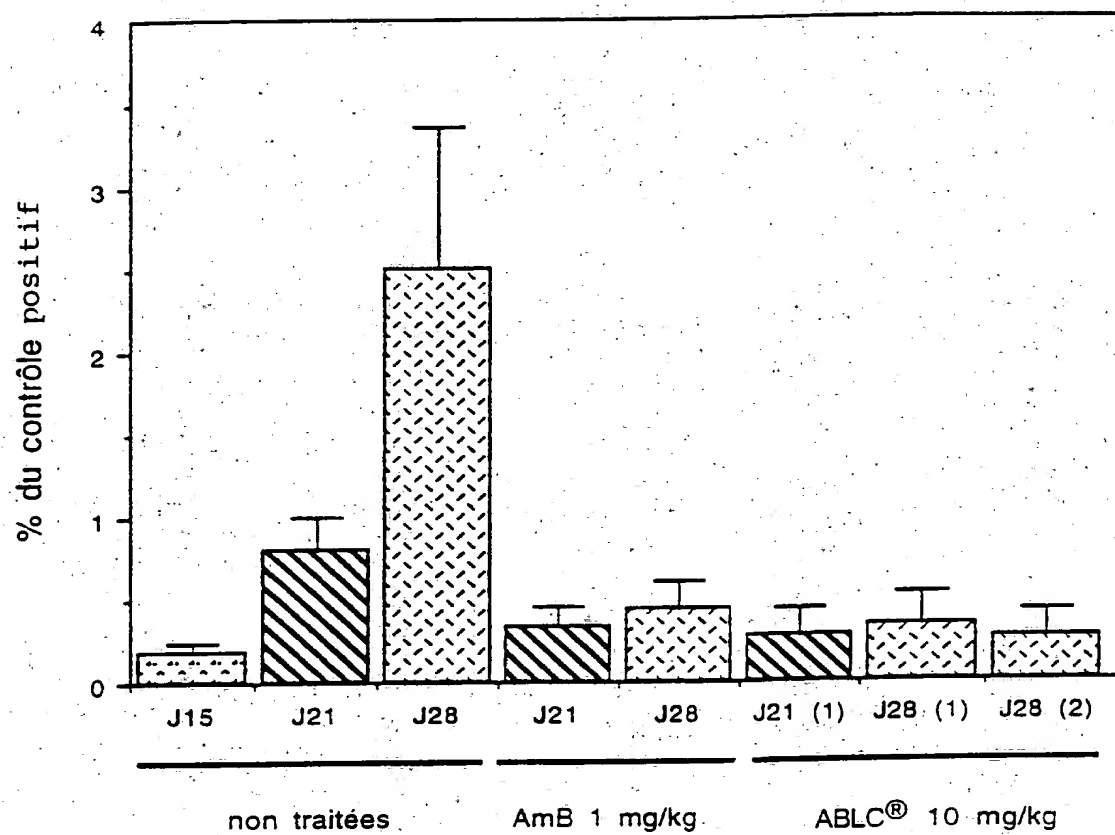


FIGURE 2





FIGURE 3



3/6

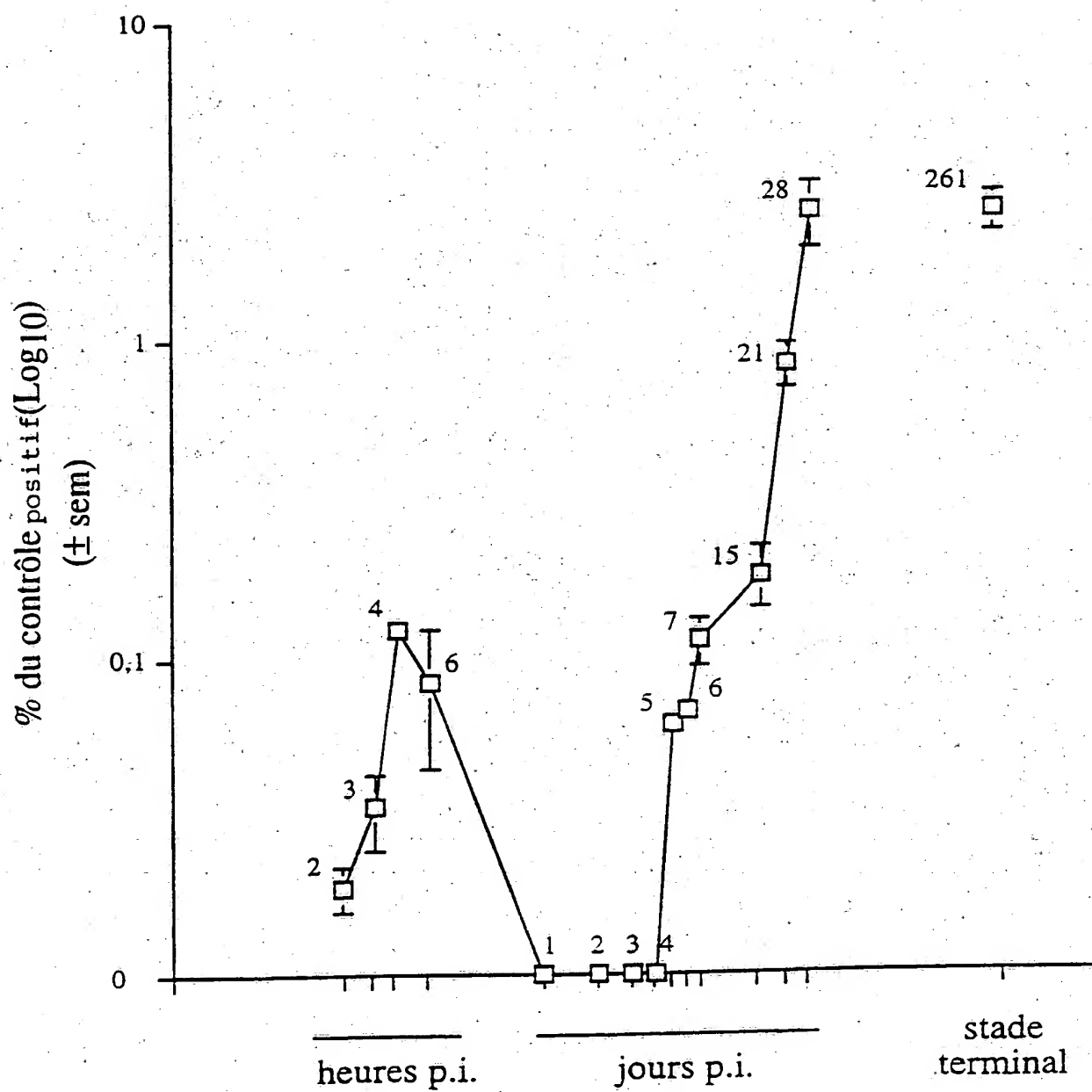
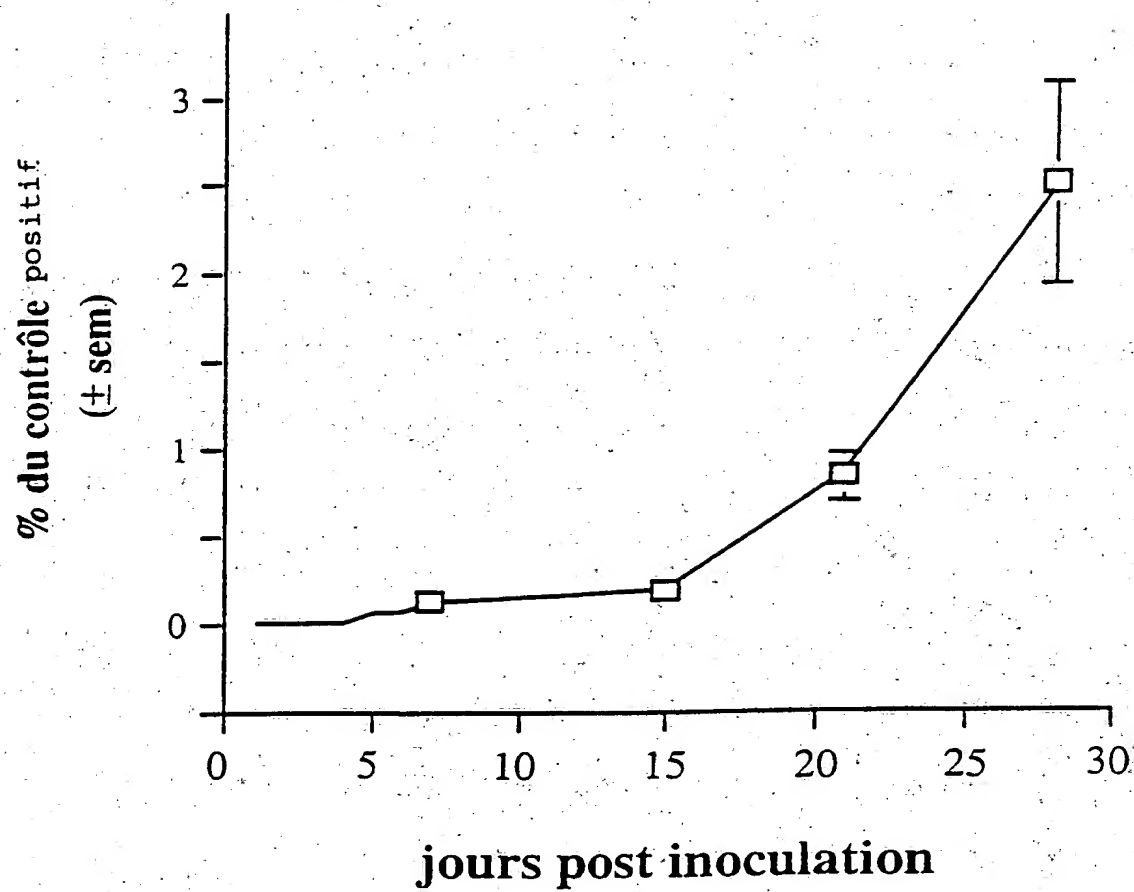


FIGURE 4



4/6

FIGURE 5



5/6

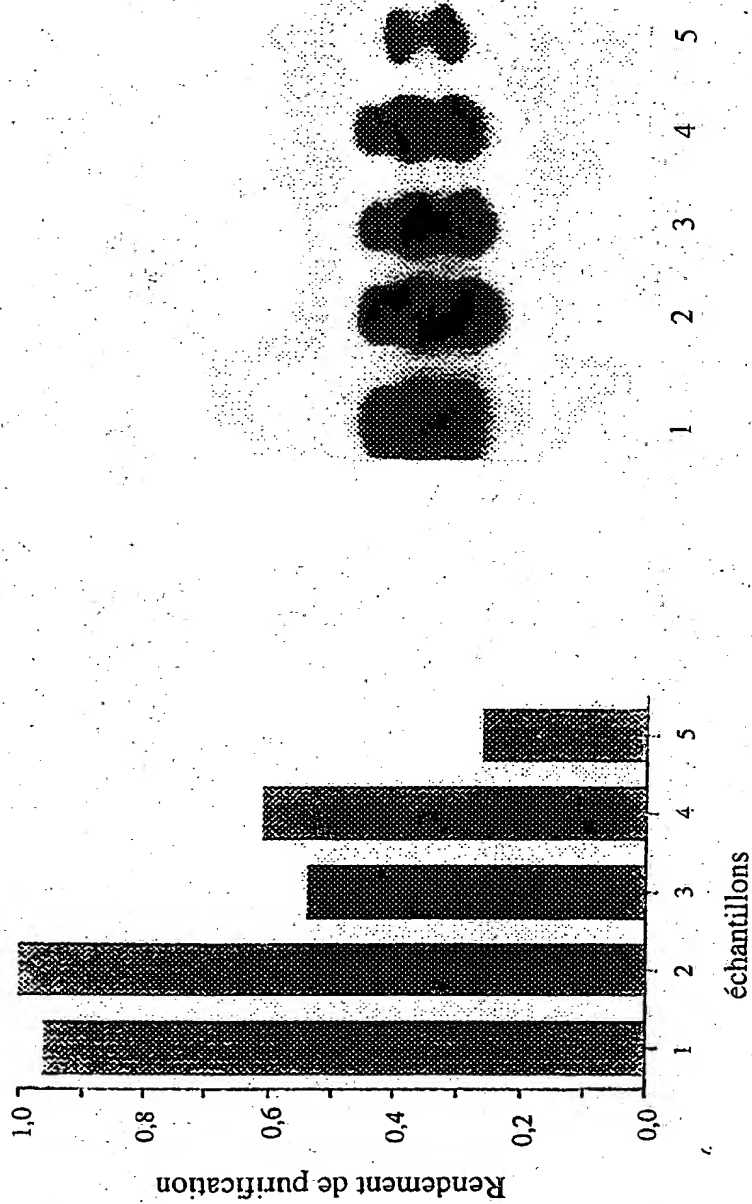


FIGURE 6





6/6

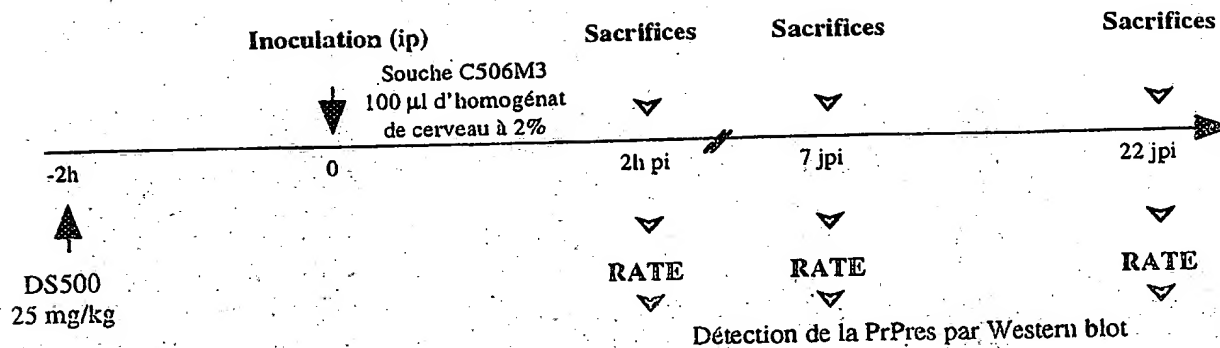


FIGURE 7

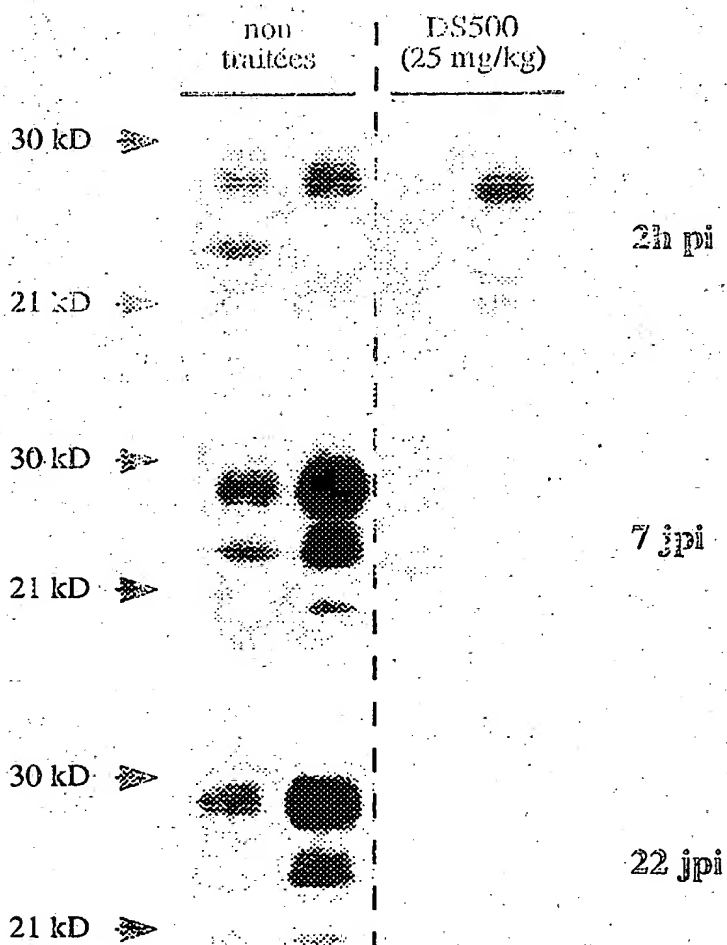


FIGURE 8



# PCT

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire BLOcp263/26P	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° PCT/FR 98/ 00063	Date du dépôt international (jour/mois/année) 14/01/1998	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 14/01/1997
Déposant  COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 4 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

- ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).
- ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).
- ☐ La demande internationale contient la divulgation d'un listage de séquence de nucléotides ou d'acides aminés et la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage de séquence
  - ☐ déposé avec la demande internationale
  - ☐ fourni par le déposant séparément de la demande internationale
    - ☐ sans être accompagnée d'une déclaration selon laquelle il n'inclut pas d'éléments allant au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle qu'elle a été déposée.
  - ☐ transcrit par l'administration

- En ce qui concerne le titre, ☐ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.  
☒ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

**METHODE DE CRIBLAGE DE SUBSTANCES A ACTION THERAPEUTIQUE DANS LE TRAITEMENT DES ENCEPHALOPATHIES SUBAIGUES SPONGIFORMES TRANSMISSIBLES**

- En ce qui concerne l'abrégé,
  - ☐ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
  - ☒ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

- La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la suivante:

Figure n°            ☐ suggérée par le déposant.  
☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.  
☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒ Aucune des figures n'est à publier.



# PCT

## REQUETE

Le soussigné requiert que la présente demande internationale soit traitée conformément au Traité de coopération en matière de brevets.

Réservé à l'office récepteur

Demande internationale n°

Date du dépôt international

Nom de l'office récepteur et "Demande internationale PCT"

Référence du dossier du déposant ou du mandataire (facultatif)  
(12 caractères au maximum) BLOcp263/26P

Cadre n° I TITRE DE L'INVENTION METHODE DE CRIBLAGE DE SUBSTANCES A ACTION THERAPEUTIQUE DANS LE TRAITEMENT DES ESST COMPRENANT UNE ETAPE D'ISOLEMENT DE LA PrPres, A PARTIR DE LA RATE, PROCEDE D'ISOLEMENT DE LA PrPres ET SES APPLICATIONS.

Cadre n° II DEPOSANT

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE  
31-33 rue de la Fédération  
75015 PARIS (FRANCE)

☐ Cette personne est aussi inventeur.

n° de téléphone

n° de télécopieur

n° de téléimprimeur

Nationalité (nom de l'Etat) : FRANCE

Domicile (nom de l'Etat) : FRANCE

Cette personne est déposant pour : ☐ tous les Etats désignés ☒ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☐ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

Cadre n° III AUTRE(S) DEPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

DESLYS Jean-Philippe  
15 allée des Pelouses  
78170 LA CELLE SAINT CLOUD (FRANCE)

Cette personne est :

☐ déposant seulement

☒ déposant et inventeur

☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) : FRANCE

Domicile (nom de l'Etat) : FRANCE

Cette personne est déposant pour : ☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☒ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

☒ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une feuille annexe.

Cadre n° IV MANDATAIRE OU REPRESENTANT COMMUN; OU ADRESSE POUR LA CORRESPONDANCE

La personne dont l'identité est donnée ci-dessous est/à été désignée pour agir au nom du ou des déposants auprès des autorités internationales compétentes, comme: ☒ mandataire ☐ représentant commun

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)

CABINET ORES  
6 avenue de Messine  
75008 PARIS (FRANCE)

n° de téléphone 01.45.62.75.00.  
01.45.62.69.99.

n° de télécopieur 01.45.62.04.86.  
01.45.63.04.47.

n° de téléimprimeur  
644 420 F

☐ Cocher cette case lorsque aucun mandataire ni représentant commun n'est/n'a été désigné et que l'espace ci-dessus est utilisé pour indiquer une adresse spéciale à laquelle la correspondance doit être envoyée.



## Suite du cadre n° III AUTRES DEPOSANTS OU (AUTRES) INVENTEURS

*Si aucun des sous-cadres suivants ne sont utilisés, la présente feuille ne doit pas être incluse dans la requête.*

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

BERINGUE Vincent

INA PG Rose des Vents 22  
78850 THIVERVAL GRIGNON (FRANCE)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
- ☒ déposant et inventeur
- ☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) : FRANCE

Domicile (nom de l'Etat) : FRANCE

Cette personne est déposant pour :

- ☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☒ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

LASMEZAS Corinne

97 rue de Crimée  
75019 PARIS (FRANCE)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
- ☒ déposant et inventeur
- ☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) : FRANCE

Domicile (nom de l'Etat) : FRANCE

Cette personne est déposant pour :

- ☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☒ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
- ☐ déposant et inventeur
- ☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est déposant pour :

- ☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☐ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
- ☐ déposant et inventeur
- ☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est déposant pour :

- ☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☐ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

☐ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une autre feuille annexe.





## Cadre n° V DESIGNATION D'ETATS

Les désignations suivantes sont faites conformément à la règle 4.9.a) (cocher les cases appropriées; une au moins doit l'être) :

## Brevet régional

- ☐ AP Brevet ARIPO : GH Ghana, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Soudan, SZ Swaziland, UG Ouganda, ZW Zimbabwe et tout autre Etat qui est un Etat contractant du Protocole de Harare et du PCT
- ☐ EA Brevet eurasien : AM Arménie, AZ Azerbaïdjan, BY Bélarus, KG Kirghizistan, KZ Kazakstan, MD République de Moldova, RU Fédération de Russie, TJ Tadjikistan, TM Turkménistan, et tout autre Etat qui est un Etat contractant de la Convention sur le brevet eurasien et du PCT
- ☒ EP Brevet européen : AT Autriche, BE Belgique, CH et LI Suisse et Liechtenstein, DE Allemagne, DK Danemark, ES Espagne, FI Finlande, FR France, GB Royaume-Uni, GR Grèce, IE Irlande, IT Italie, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Pays-Bas, PT Portugal, SE Suède et tout autre Etat qui est un Etat contractant de la Convention sur le brevet européen et du PCT
- ☐ OA Brevet OAPI : BF Burkina Faso, BJ Bénin, CF République centrafricaine, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroun, GA Gabon, GN Guinée, ML Mali, MR Mauritanie, NE Niger, SN Sénégal, TD Tchad, TG Togo et tout autre Etat qui est un Etat membre de l'OAPI et un Etat contractant du PCT (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée)

## Brevet national (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée) :

- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> AL Albanie                                    | <input type="checkbox"/> LV Lettonie                                |
| <input type="checkbox"/> AM Arménie                                    | <input type="checkbox"/> MD République de Moldova                   |
| <input type="checkbox"/> AT Autriche                                   | <input type="checkbox"/> MG Madagascar                              |
| <input type="checkbox"/> AU Australie                                  | <input type="checkbox"/> MK Ex-République yougoslave de Macédoine   |
| <input type="checkbox"/> AZ Azerbaïdjan                                |   |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnie-Herzégovine                         | <input type="checkbox"/> MN Mongolie                                |
| <input type="checkbox"/> BB Barbade                                    | <input type="checkbox"/> MW Malawi                                  |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarie                                   | <input type="checkbox"/> MX Mexique                                 |
| <input type="checkbox"/> BR Brésil                                     | <input type="checkbox"/> NO Norvège                                 |
| <input type="checkbox"/> BY Bélarus                                    | <input type="checkbox"/> NZ Nouvelle-Zélande                        |
| <input type="checkbox"/> CA Canada                                     | <input type="checkbox"/> PL Pologne                                 |
| <input type="checkbox"/> CH et LI Suisse et Liechtenstein              | <input type="checkbox"/> PT Portugal                                |
| <input type="checkbox"/> CN Chine                                      | <input type="checkbox"/> RO Roumanie                                |
| <input type="checkbox"/> CU Cuba                                       | <input type="checkbox"/> RU Fédération de Russie                    |
| <input type="checkbox"/> CZ République tchèque                         | <input type="checkbox"/> SD Soudan                                  |
| <input type="checkbox"/> DE Allemagne                                  | <input type="checkbox"/> SE Suède                                   |
| <input type="checkbox"/> DK Danemark                                   | <input type="checkbox"/> SG Singapour                               |
| <input type="checkbox"/> EE Estonie                                    | <input type="checkbox"/> SI Slovénie                                |
| <input type="checkbox"/> ES Espagne                                    | <input type="checkbox"/> SK Slovaquie                               |
| <input type="checkbox"/> FI Finlande                                   | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone                            |
| <input type="checkbox"/> GB Royaume-Uni                                | <input type="checkbox"/> TJ Tadjikistan                             |
| <input type="checkbox"/> GE Géorgie                                    | <input type="checkbox"/> TM Turkménistan                            |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana                                      | <input type="checkbox"/> TR Turquie                                 |
| <input type="checkbox"/> HU Hongrie                                    | <input type="checkbox"/> TT Trinité-et-Tobago                       |
| <input type="checkbox"/> IL Israël                                     | <input type="checkbox"/> UA Ukraine                                 |
| <input type="checkbox"/> IS Islande                                    | <input type="checkbox"/> UG Ouganda                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japon                           | <input checked="" type="checkbox"/> US Etats-Unis d'Amérique        |
| <input type="checkbox"/> KE Kenya                                      |   |
| <input type="checkbox"/> KG Kirghizistan                               | <input type="checkbox"/> UZ Ouzbékistan                             |
| <input type="checkbox"/> KP République populaire démocratique de Corée | <input type="checkbox"/> VN Viet Nam                                |
|  | <input type="checkbox"/> YU Yougoslavie                             |
| <input type="checkbox"/> KR République de Corée                        | <input type="checkbox"/> ZW Zimbabwe                                |
| <input type="checkbox"/> KZ Kazakstan                                  | Cases réservées pour la désignation (aux fins d'un brevet national) |
| <input type="checkbox"/> LC Sainte-Lucie                               | d'Etats qui sont devenus parties au PCT après la publication de la  |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka                                  | présente feuille :  |
| <input type="checkbox"/> LR Libéria                                    | <input type="checkbox"/>  |
| <input type="checkbox"/> LS Lesotho                                    | <input type="checkbox"/>  |
| <input type="checkbox"/> LT Lituanie                                   | <input type="checkbox"/>  |
| <input type="checkbox"/> LU Luxembourg                                 | <input type="checkbox"/>  |

Outre les désignations faites ci-dessus, le déposant fait aussi conformément à la règle 4.9.b) toutes les désignations qui seraient autorisées en vertu du PCT, sauf la désignation de \_\_\_\_\_

Le déposant déclare que ces désignations additionnelles sont faites sous réserve de confirmation et que toute désignation qui n'est pas confirmée avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité doit être considérée comme retirée par le déposant à l'expiration de ce délai. (Pour confirmer une désignation, il faut déposer une déclaration contenant la désignation en question et payer les taxes de désignation et de confirmation. La confirmation doit parvenir à l'office récepteur dans le délai de 15 mois.)



<b>Cadre n° VI REVENDICATION DE PRIORITE</b>		D'autres revendications de priorité sont indiquées dans le cadre supplémentaire <input type="checkbox"/>									
La priorité de la ou des demandes antérieures suivantes est revendiquée :											
Pays <i>(dans lequel ou pour lequel la demande a été déposée)</i>	Date de dépôt <i>(jour/mois/année)</i>	Demande n°	Office de dépôt <i>(seulement s'il s'agit d'une demande régionale ou internationale)</i>								
(1)  FRANCE	14 janvier 1997	97 00278									
(2)											
(3)											
<p><i>Cocher la case ci-dessous si la copie certifiée conforme de la demande antérieure doit être délivrée par l'office qui, aux fins de la présente demande internationale, est l'office récepteur (une taxe peut être exigée) :</i></p> <p><input type="checkbox"/> L'office récepteur est prié de préparer, et de transmettre au Bureau international, une copie certifiée conforme de la ou des demandes antérieures indiquées ci-dessus au(x) point(s) : _____</p>											
<b>Cadre n° VII ADMINISTRATION CHARGÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE</b>											
<p>Choix de l'administration chargée de la recherche internationale (ISA)  <i>(Si plusieurs administrations chargées de la recherche internationale sont compétentes pour procéder à la recherche internationale, indiquer l'administration choisie; le code à deux lettres peut être utilisé) :</i> ISA / _____</p> <p>Recherche antérieure Remplir si une recherche (internationale, de type international ou autre) a déjà été effectuée par l'administration chargée de la recherche internationale ou demandée à cette administration et si cette administration est maintenant priée de fonder la recherche internationale, dans la mesure du possible, sur les résultats de cette recherche antérieure. Pour permettre d'identifier cette recherche ou cette demande de recherche, donner les renseignements demandés ci-après pour la demande de brevet pertinente (ou sa traduction) ou pour la demande de recherche :</p> <p>Pays (ou office régional) : _____ Date (jour/mois/année) : _____ Numéro : FA 540708</p>											
<b>Cadre n° VIII BORDEREAU</b>											
<p>La présente demande internationale comprend le nombre de feuilles suivant :</p> <p>1. requête : 4 feuilles</p> <p>2. description : 13 feuilles</p> <p>3. revendications : 4 feuilles</p> <p>4. abrégé : 1 feuille</p> <p>5. dessins : 6 feuilles</p> <p style="text-align: right;">Total : 28 feuilles</p>		<p>Le ou les éléments cochés ci-après sont joints à la présente demande internationale :</p> <table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;">1. <input type="checkbox"/> pouvoir distinct signé</td> <td style="width: 50%;">5. <input type="checkbox"/> feuille de calcul des taxes</td> </tr> <tr> <td>2. <input type="checkbox"/> copie du pouvoir général</td> <td>6. <input type="checkbox"/> indications séparées concernant des micro-organismes déposés</td> </tr> <tr> <td>3. <input type="checkbox"/> explication de l'absence d'une signature</td> <td>7. <input type="checkbox"/> listage de séquence de nucléotides ou d'acides aminés (disquette)</td> </tr> <tr> <td>4. <input type="checkbox"/> document(s) de priorité (indiqué(s) dans le cadre n° VI au(x) point(s)) :</td> <td>8. <input checked="" type="checkbox"/> autres éléments (préciser) Rapport de Recherche n° FA 540708</td> </tr> </table>		1. <input type="checkbox"/> pouvoir distinct signé	5. <input type="checkbox"/> feuille de calcul des taxes	2. <input type="checkbox"/> copie du pouvoir général	6. <input type="checkbox"/> indications séparées concernant des micro-organismes déposés	3. <input type="checkbox"/> explication de l'absence d'une signature	7. <input type="checkbox"/> listage de séquence de nucléotides ou d'acides aminés (disquette)	4. <input type="checkbox"/> document(s) de priorité (indiqué(s) dans le cadre n° VI au(x) point(s)) :	8. <input checked="" type="checkbox"/> autres éléments (préciser) Rapport de Recherche n° FA 540708
1. <input type="checkbox"/> pouvoir distinct signé	5. <input type="checkbox"/> feuille de calcul des taxes										
2. <input type="checkbox"/> copie du pouvoir général	6. <input type="checkbox"/> indications séparées concernant des micro-organismes déposés										
3. <input type="checkbox"/> explication de l'absence d'une signature	7. <input type="checkbox"/> listage de séquence de nucléotides ou d'acides aminés (disquette)										
4. <input type="checkbox"/> document(s) de priorité (indiqué(s) dans le cadre n° VI au(x) point(s)) :	8. <input checked="" type="checkbox"/> autres éléments (préciser) Rapport de Recherche n° FA 540708										
La figure n° _____ des dessins (le cas échéant) est proposée pour publication avec l'abrégé.											
<b>Cadre n° IX SIGNATURE DU DÉPOSANT OU DU MANDATAIRE</b>											
A côté de chaque signature, indiquer le nom du signataire et, si cela n'apparaît pas clairement à la lecture de la requête, à quel titre l'intéressé signe.											
B. ORES											

Réservé à l'office récepteur	
1. Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale :	2. Dessins : <input type="checkbox"/> reçus :  <input type="checkbox"/> non reçus :
3. Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale :	
4. Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT :	
5. Administration chargée de la recherche internationale indiquée par le déposant : ISA / _____	6. <input type="checkbox"/> Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche

Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international :	Réservé au Bureau international
--	---------------------------------



## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE LA RECEPTION DE  
L'EXEMPLAIRE ORIGINAL

(règle 24.2.a) du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

CABINET ORES  
6, avenue de Messine  
F-75008 Paris  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 24 février 1998 (24.02.98)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire BLOcp263/26P	Demande internationale no PCT/FR98/00063

Il est notifié au déposant que le Bureau international a reçu l'exemplaire original de la demande internationale précisée ci-après.

Noms du ou des déposants et de l'Etat ou des Etats pour lesquels ils sont déposants:

COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE (pour tous les Etats désignés sauf US)  
DESLYS, Jean-Philippe etc. (pour US seulement)

Date du dépôt international : 14 janvier 1998 (14.01.98)

Date(s) de priorité revendiquée(s) : 14 janvier 1997 (14.01.97)

Date de réception de l'exemplaire original  
par le Bureau international : 23 février 1998 (23.02.98)

Liste des offices désignés

EP : AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE  
National : JP, US

## ATTENTION

Le déposant doit soigneusement vérifier les indications figurant dans la présente notification. En cas de divergence entre ces indications et celles que contient la demande internationale, il doit aviser immédiatement le Bureau international.

En outre l'attention du déposant est appelée sur les renseignements donnés dans l'annexe en ce qui concerne

- ☒ les délais dans lesquels doit être abordée la phase nationale
- ☒ la confirmation des désignations faites par mesure de précaution
- ☒ les exigences relatives aux documents de priorité.

Une copie de la présente notification est envoyée à l'office récepteur et à l'administration chargée de la recherche internationale.

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé Athina Nickitas-Etienne no de téléphone: (41-22) 338.83.38
--	---



## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION RELATIVE A LA PRESENTATION  
DU DOCUMENT DE PRIORITE

(instruction administrative 411 du PCT)

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

CABINET ORES  
6, avenue de Messine  
F-75008 Paris  
FRANCE

CABINET ORES

- 9. AVR. 1998

Date d'expédition (jour/mois/année) 02 avril 1998 (02.04.98)		NOTIFICATION IMPORTANTE	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire BLOcp263/26P			
Demande internationale no PCT/FR98/00063	Date du dépôt international 14 janvier 1998 (14.01.98)	Date de priorité 14 janvier 1997 (14.01.97)	
Déposant COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE etc			

La date de réception par le Bureau international du ou des documents de priorité correspondant à la ou aux demandes suivantes est notifiée au déposant:

<u>Demande antérieure no:</u>	<u>Date de priorité:</u>	<u>Pays dans lequel ou pour lequel la demande a été déposée:</u>	<u>Date de réception du document de priorité</u>
97/00278	14 jan 1997 (14.01.97)	FR	01 avr 1998 (01.04.98)

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colmbettes 1211 Genève 20, Suisse  no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé:  Athina Nickitas-Etienne  no de téléphone: (41-22) 338.83.38
---	--



100-100000

CONFIDENTIAL

CONFIDENTIAL - SECURITY INFORMATION

CONFIDENTIAL - SECURITY INFORMATION



PCT

**AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA  
COMMUNICATION DE LA DEMANDE  
INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES**

(règle 47.1.c), première phrase, du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

CABINET ORES  
6, avenue de Messine  
F-75008 Paris  
FRANCE

CABINET ORÈS

24 JUL 1998

Date d'expédition (jour/mois/année) 16 juillet 1998 (16.07.98)		
Référence du dossier du déposant ou du mandataire BLOcp263/26P		AVIS IMPORTANT
Demande internationale no PCT/FR98/00063	Date du dépôt international (jour/mois/année) 14 janvier 1998 (14.01.98)	Date de priorité (jour/mois/année) 14 janvier 1997 (14.01.97)
Déposant COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE etc		

1. Il est notifié par la présente qu'à la date indiquée ci-dessus comme date d'expédition de cet avis, le Bureau international a communiqué, comme le prévoit l'article 20, la demande internationale aux offices désignés suivants:

EP,JP,US

Conformément à la règle 47.1.c), troisième phrase, ces offices acceptent le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien eu lieu à la date d'expédition indiquée plus haut, et le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

2. Les offices désignés suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle cette communication doit être effectuée à cette date:

Aucun

La communication sera effectuée seulement sur demande de ces offices. De plus, le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale aux offices en question (règle 49.1)a-bis)).

3. Le présent avis est accompagné d'une copie de la demande internationale publiée par le Bureau international le 16 juillet 1998 (16.07.98) sous le numéro WO 98/30909

**RAPPEL CONCERNANT LE CHAPITRE II (article 31.2)a) et règle 54.2)**

Si le déposant souhaite reporter l'ouverture de la phase nationale jusqu'à 30 mois (ou plus pour ce qui concerne certains offices) à compter de la date de priorité, la **demande d'examen préliminaire international** doit être présentée à l'administration compétente chargée de l'examen préliminaire international avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité.

Il appartient exclusivement au déposant de veiller au respect du délai de 19 mois.

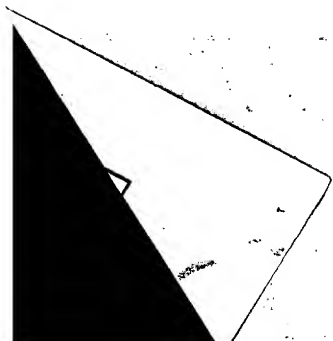
Il est à noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

**RAPPEL CONCERNANT L'OUVERTURE DE LA PHASE NATIONALE (article 22 ou 39.1))**

Si le déposant souhaite que la demande internationale procède en phase nationale, il doit, dans le délai de 20 mois ou de 30 mois, ou plus pour ce qui concerne certains offices, accomplir les actes mentionnés dans ces dispositions auprès de chaque office désigné ou élu.

Pour d'autres informations importantes concernant les délais et les actes à accomplir pour l'ouverture de la phase nationale, voir l'annexe du formulaire PCT/IB/301 (Notification de la réception de l'exemplaire original) et le volume II du Guide du déposant du PCT.

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé J. Zahra
no de télécopieur (41-22) 740.14.35	no de téléphone (41-22) 338.83.38



# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

REC'D 28 APR 1999

## RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)



Référence du dossier du déposant ou du mandataire BLOcp263/26P	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR98/00063	Date du dépôt international (jour/mois/année) 14/01/1998	Date de priorité (jour/mois/année) 14/01/1997
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB G01N33/68		
Déposant COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE et al.		

- Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
- Ce RAPPORT comprend 7 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
  - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

- Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 10/08/1998	Date d'achèvement du présent rapport 22.04.99
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. (+49-89) 2399-0 Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Fonctionnaire autorisé Luis Alves, D N° de téléphone (+49-89) 2399 8695 



**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR98/00063

**I. Base du rapport**

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après *(les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.)* :

**Description, pages:**

1-13                      version initiale

**Revendications, N°:**

1-14                      version initiale

**Dessins, feuilles:**

1/6-6/6                      version initiale

**2. Les modifications ont entraîné l'annulation :**

- ☐ de la description,      pages :
- ☐ des revendications,    n°s :
- ☐ des dessins,            feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

**4. Observations complémentaires, le cas échéant :**



**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR98/00063

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

**1. Déclaration**

Nouveauté	Oui : Revendications 1-14
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 12
	Non : Revendications 1-11, 13,14
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-14
	Non : Revendications

**2. Citations et explications**

**voir feuille séparée**

**VII. Irrégularités dans la demande internationale**

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :

**voir feuille séparée**

**VIII. Observations relatives à la demande internationale**

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

**voir feuille séparée**





Il est fait référence aux documents suivants :

D1: D. MCKENZIE ET AL.: "Amphotericin B delays both scrapie agent replication and PrP-res accumulation early in infection." JOURNAL OF VIROLOGY., vol. 68, no. 11, novembre 1994, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY US, pages 7534-7536.

D2: US-A-5 276 059

**Point V:**

1. Document D1 divulgue la détermination de l'effet du traitement avec de l'amphotericin de hamsters avec tremblante. Les animaux sont inoculés avec un homogenat de cerveau de hamsters infectés avec tremblante (souche 263K). Cette étape est suivie de l'administration de l'amphotericin B (ou non pour les contrôles). La AmB est administrée à la raison de 1 mg/kg, pendant 6 ou 7 jours, le premier jour c'est le jour après l'inoculation. Les animaux sont sacrifiés 4, 5, 6, 8 et 10 semaines après inoculation.  
Pour déterminer l'effet de l'AmB un des procédés utilisés est le prélèvement du cerveau et la détermination de la PrPres.  
L'accumulation de AmB dans les animaux traités est diminuée d'un facteur de 5 à 25 par rapport aux animaux contrôle, 4 à 6 semaines après l'inoculation (voir p. 7535, colonne de la gauche, dernière ligne à colonne de la droite, premier paragraphe).  
Donc, ce document divulgue une méthode permettant de déterminer l'effet d'une substance 4 semaines (28 jours) après l'inoculation.  
La méthode dans la présente revendication 1 permet la détermination de l'effet entre tb (ta - ta+15) et tc (ta+20 - ta+30), donc par exemple 30 jours après l'inoculation.  
Donc le procédé divulgué dans D1 est distingué du procédé dans la présente revendication 1 par la détection de la PrPres dans la rate.

Le problème que se propose de résoudre la présente invention peut donc être



**Point VII:**

1. Contrairement à ce qu'exige la règle 5.1 a) ii) PCT, la description n'indique pas l'état de la technique antérieure pertinent exposé dans les documents D1 et D2 et ne cite pas ces documents.

**Point VIII:**

1. Les termes "de préférence", "éventuellement", "par exemple", "comprend essentiellement" et "tel que" utilisés dans les revendications 1, 2, 7 à 9 et 11 à 13 sont vagues et équivoques, et laissent un doute quant à la signification des caractéristiques techniques auxquelles ils se réfèrent. L'objet des dites revendications n'est donc pas clairement défini (article 6 PCT).  
Dans les revendications 7 et 8, par exemple, l'utilisation de l'expression "et, si nécessaire" rend l'étape (iii) du procédé entièrement optionnelle.
2. La revendication 3 n'est pas claire à cause de l'utilisation d'une expression entre parenthèses.



internationale (article 33(2) PCT).

Le document D1, qui est considéré comme l'état de la technique le plus proche, divulgue un procédé d'isolement de la PrPres à partir du cerveau comprenant l'homogénéisation du tissu à 20% dans un tampon et l'incubation avec une solution contenant proteinase K, laurylsarcosine et 10% NaCl (voir p. 7535, colonne de la droite). La PrPres isolée est détectée par immunoblot.

D1 ne divulgue pas des conditions de centrifugation. Il est toutefois évident qu'une étape de séparation est comprise dans le procédé avant l'électrophorèse.

Le problème que se propose de résoudre l'objet des revendications 7 est 8 de la demande peut donc être considéré comme étant l'amélioration du procédé d'isolement de la PrPres.

La solution dans les revendications 7 et 8 consiste à optimiser les conditions de centrifugation, ce que semble être une pratique courante de la personne du métier. L'étape (iii) dans les revendications 7 et 8 est facultative et n'a pas d'effet limitatif sur la portée des revendications (voir point VIII.1).

En conséquence, l'objet des revendications 7, 8 et 14 ne semble donc pas impliquer d'activité inventive (article 33(3) PCT).

Les revendications dépendantes 9 à 11 et 13 ne contiennent aucune caractéristique qui, en combinaison avec celles de l'une quelconque des revendications auxquelles elles se réfèrent, définisse un objet qui satisfasse aux exigences du PCT en ce qui concerne l'activité inventive (article 33(3) PCT).

La solution d'extraction dans le procédé dans la revendication 12 comprend un détergent anionique et un détergent zwitterionique. Cette sélection résulte en un rendement d'isolation plus élevé (figure 6 de la demande). Donc, il apparaît que l'objet de la revendication 12 implique une activité inventive (Article 33(3) PCT).



considéré comme étant une méthode alternative.

Cependant, pour l'homme du métier il serait évident que la rate peut aussi être utilisée dans le même but, comme dans D2. Ce document divulgue l'utilisation d'une substance (Congo Red) pour le traitement de, par exemple, tremblante chez les souris. L'effet de l'administration de Congo Red est déterminé par le procédé suivant: les animaux sont inoculés avec un homogenat de cerveau de souris infectés avec tremblante ; six heures après l'administration de Congo Red est initiée ; après cinq semaines (35 jours) les animaux sont sacrifiés et le taux de PrPres dans la rate est déterminé ; les animaux traités ont un taux 87% inférieur par rapport aux contrôles (voir colonne 1.1, "Effet of ... in scrapie-infected mice"). En conclusion, D2 divulgue l'utilisation du taux de PrPres pour déterminer le potentiel thérapeutique d'une substance. En effet, le procédé revendiqué dans la revendication 1 s'en distingue seulement par le moment de prélèvement de la rate.

Dans la revendication 1 il est fait référence au procédé d'isolement de la PrPres à partir de la rate. Cependant des procédés convenables sont déjà connus donc cette caractéristique ne rend pas inventive l'objet de la revendication.

En conséquence, il apparaît que l'objet de la revendication 1 manque d'activité inventive (article 33(3) PCT).

Les revendications dépendantes 2 à 6 ne contiennent aucune caractéristique qui, en combinaison avec celles de l'une quelconque des revendications auxquelles elles se réfèrent, définisse un objet qui satisfasse aux exigences du PCT en ce qui concerne l'activité inventive (article 33(3) PCT), parce que les caractéristiques de ces revendications sont déjà divulguées dans D1.

2. Aucun des documents cités dans le rapport de recherche internationale ne divulgue un procédé d'isolement de la PrPres comme dans les revendications 7 et 8. Par conséquent, l'objet des revendications 7, 8, 14 et des revendications dépendantes 9 à 13 est nouveau par rapport aux documents cités dans le rapport de recherche





09/341539  
Translation

5000

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

3

Applicant's or agent's file reference BLOcp263/26P	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR98/00063	International filing date (day/month/year) 14 January 1998 (14.01.1998)	Priority date (day/month/year) 14 January 1997 (14.01.1997)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 33/68		
Applicant COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.

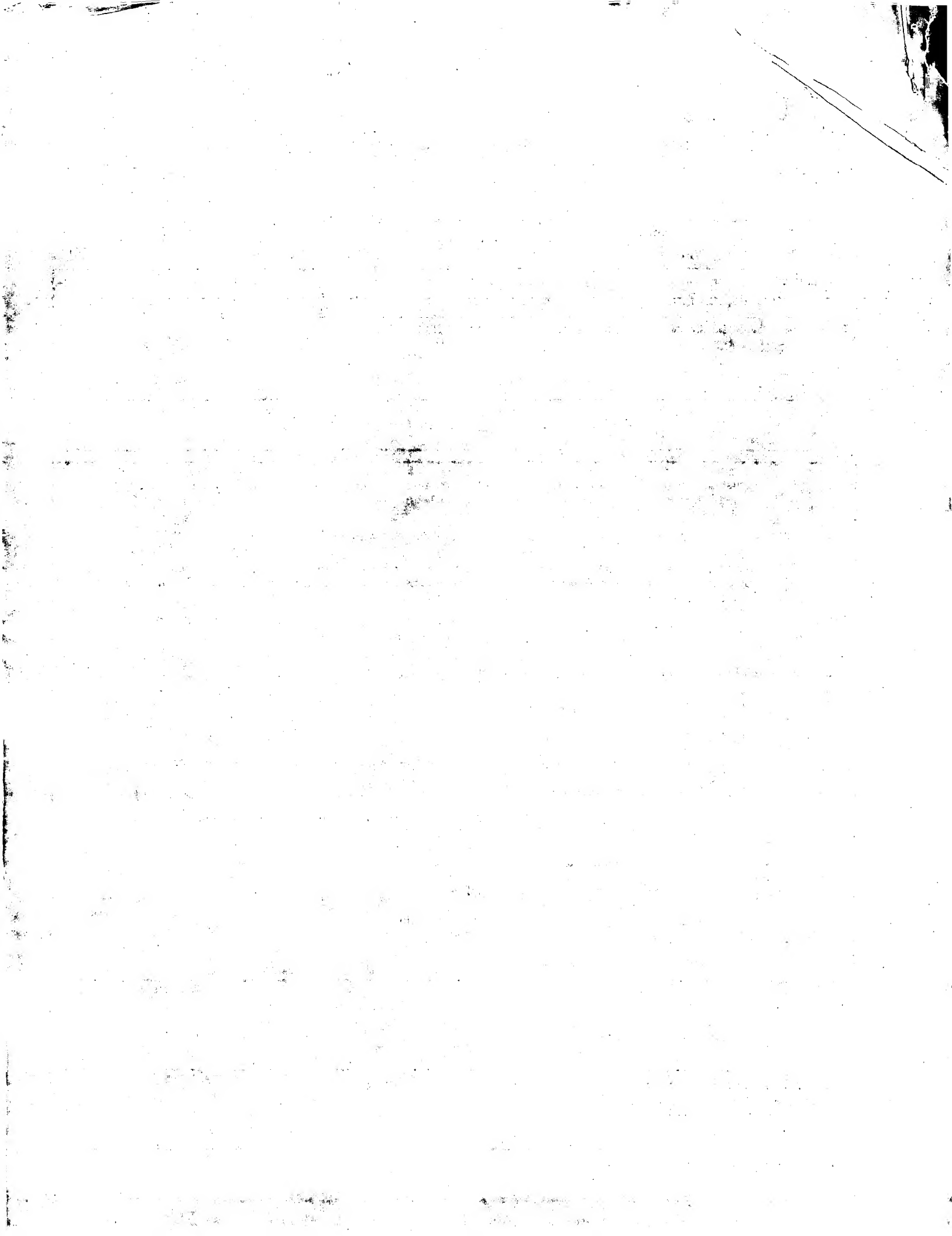
☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of        sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 10 August 1998 (10.08.1998)	Date of completion of this report 22 April 1999 (22.04.1999)
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany Facsimile No. 49-89-2399-4465	Authorized officer  Telephone No. 49-89-2399-0



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR98/00063

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

☐ the international application as originally filed.

☒ the description, pages 1-13, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

☒ the claims, Nos. 1-14, as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

☒ the drawings, sheets/fig 1/6-6/6, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

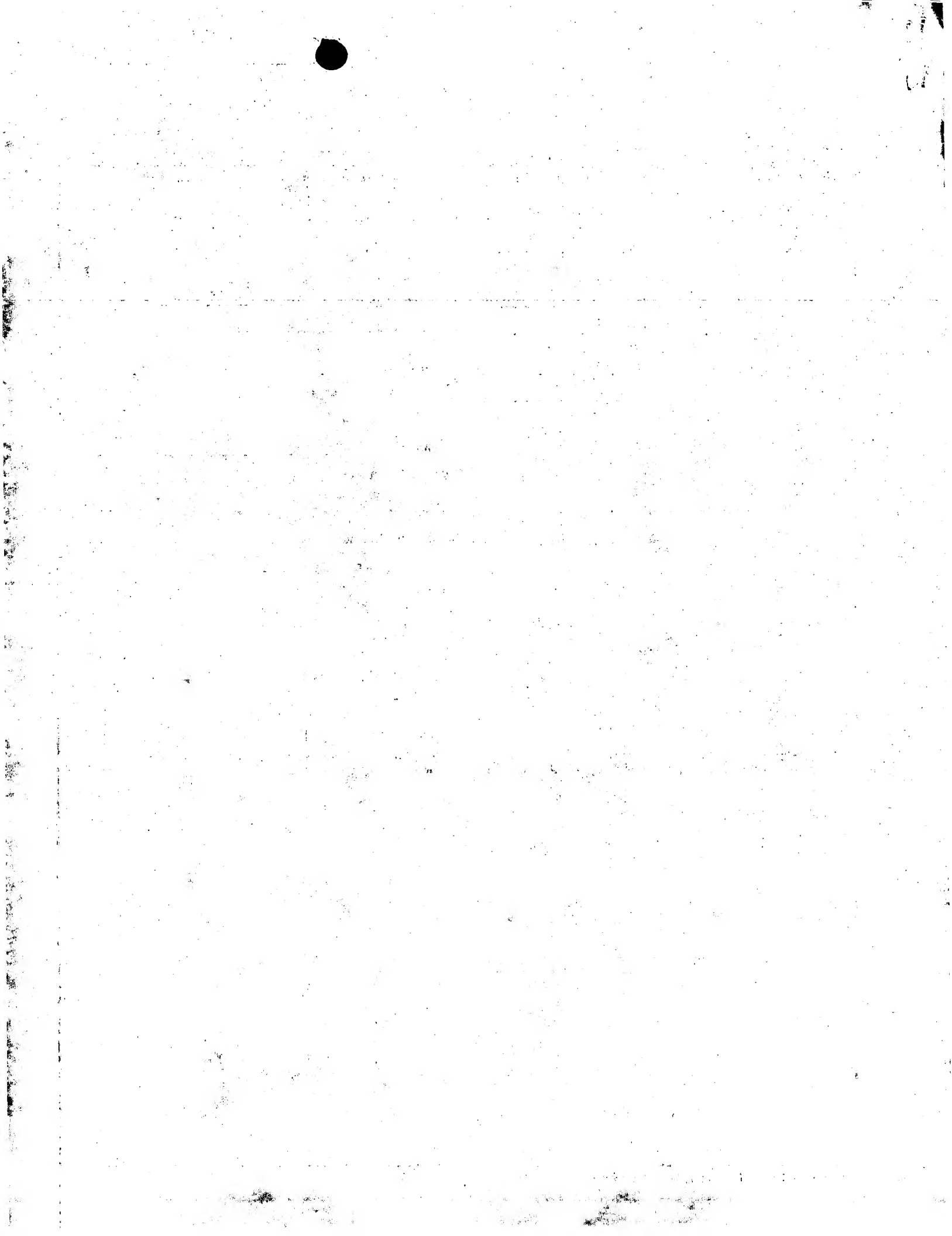
☐ the description, pages \_\_\_\_\_

☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_

☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 98/00063

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	12	YES
	Claims	1-11, 13, 14	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

Reference is made to the following documents:

D1: D. MCKENZIE ET AL.: "Amphotericin B delays both scrapie agent replication and PrP-res accumulation early in infection". JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 68, no. 11, November 1994, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY US, pages 7534-7536.

D2: US-A-5 276 059.

- Document D1 discloses the determination of the effects of treatment with amphotericin of hamsters suffering from scrapie. The animals are inoculated with a homogenate of the brain of scrapie-infected hamsters (263K strain). This step is followed by the administration of amphotericin B (or not, in the case of the control animals). AmB is administered in a dosage of 1 mg/kg, for 6 or 7 days, the first day being the day following inoculation. The animals are sacrificed 4, 5, 6, 8 and 10 weeks after inoculation.

In order to determine the effect of AmB, one of the methods used is the removal of the brain and the determination of PrPres.



The accumulation of AmB in the treated animals is reduced by a factor of 5 to 25 in relation to the control animals, 4 to 6 weeks after inoculation (see page 7535, left-hand column, last line to right-hand column, first paragraph).

Therefore, said document discloses a method for determining the effect of a substance 4 weeks (28 days) after inoculation.

The method of the present Claim 1 enables the effect to be determined between  $t_b$  ( $t_a - t_a+15$ ) and  $t_c$  ( $t_a+20 - t_a+30$ ), i.e., for example 30 days after inoculation.

Therefore, the method disclosed in D1 differs from the method of the present Claim 1 by the detection of PrPres in the spleen.

The problem which the present invention aims to solve can therefore be considered to be an alternative method.

However, for a person skilled in the art, it would be obvious that the spleen can also be used for the same purpose as in D2. This document discloses the use of a substance (Congo Red) for the treatment of, e.g. scrapie in mice. The effect of the administration of Congo Red is determined by the following method: the animals are inoculated with a homogenate of the brain of scrapie-infected mice; six hours later, administration of Congo Red is begun; after five weeks (35 days), the animals are sacrificed and the rate of PrPres in the spleen is determined; the treated animals have a rate which is 87% lower than that of the control animals (see Column 11, "effect of... in scrapie-infected mice"). In conclusion, D2 discloses the use of the rate of PrPres to determine the therapeutic potential of a





substance. Indeed, the method claimed in Claim 1 differs therefrom only by the time of removal of the spleen.

In Claim 1, reference is made to the method for isolating PrPres from the spleen. However, suitable methods are already known. Therefore, this feature does not make the subject matter of the claim inventive.

Consequently, it appears that the subject matter of Claim 1 lacks inventive step (PCT Article 33(3)).

Dependent Claims 2 to 6 do not contain any feature which, in combination with those of any of the claims to which they refer, defines a subject matter which meets the PCT requirements with respect to inventive step (PCT Article 33(3)), since the features of these claims are already disclosed in D1.

2. None of the documents cited in the international search report discloses a method for isolating PrPres as per Claims 7 and 8. Consequently, the subject matter of Claims 7, 8, 14 and of dependent Claims 9 to 13 is novel over the search report citations (PCT Article 33(2)).

Document D1, which is considered the closest prior art, discloses a method for isolating PrPres from the brain, including the step of homogenising the tissue at 20% in a buffer and incubating it with a solution containing proteinase K, laurylsarcosine and 10% NaCl (see page 7535, right-hand column). The isolated PrPres is detected by immunoblot.



D1 does not disclose centrifugation conditions. It is however obvious that a separation step is included in the method before the electrophoresis step.

The problem which the subject matter of Claims 7 and 8 proposes to solve can therefore be considered to be that of improving the method for isolating the PrPres.

The solution contained in Claims 7 and 8 comprising optimising centrifugation conditions, which appears to be standard practice for a person skilled in the art. Step (iii) in Claims 7 and 8 is optional and has no limiting effect on the scope of the claims (see VIII.1).

Consequently, the subject matter of Claims 7, 8 and 14 does not appear to involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

Dependent Claims 9 to 11 and 13 do not contain any feature which, in combination with those of any of the Claims to which they refer, defines a subject matter which meets the PCT requirements with respect to inventive step (PCT Article 33(3)).

The extraction solution in the method of Claim 12 includes an anionic detergent and a zwitterionic detergent. This selection results in a higher isolation rate (Figure 6 of the application). Therefore, it appears that the subject matter of Claim 12 involves an inventive step (PCT Article 33(3)).



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 98/00063

## VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not outline the relevant prior art set forth in documents D1 and D2 and does not cite these documents.



## VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. The terms "preferably", "optionally", "for example", "essentially contains" and "such as", used in Claims 1, 2, 7 to 9 and 11 to 13 are vague and ambiguous, and leave a doubt as to the meaning of the technical features to which they refer. the subject matter of said Claims has therefore not been clearly defined (PCT Article 6).

In Claims 7 and 8, for instance, the use of the expression "and, if necessary" means that step (iii) of the method is entirely optional.

2. Claim 3 is unclear owing to the use of an expression between brackets.

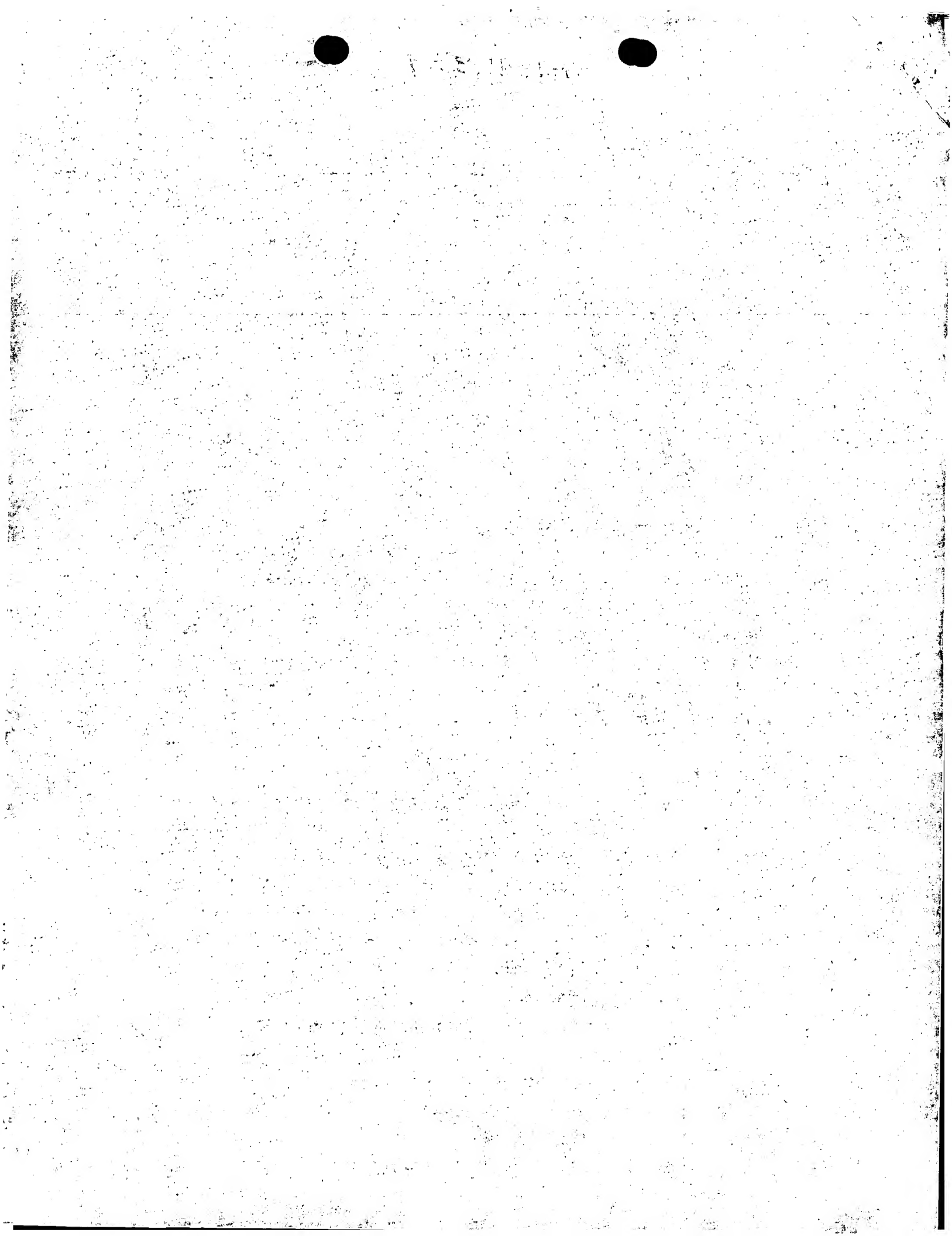




A methodCLAIMS

1. ~~Method~~ for screening substances capable of having therapeutic action in the treatment of transmissible subacute spongiform encephalopathies (TSSEs), characterized in that it comprises the following steps:
- a) inoculation at time  $t_A$ , into at least one laboratory animal selected from the group consisting of rodents, by any appropriate route, of a nonconventional transmissible agent (NCTA);
- b) administration to the said laboratory animal, by any appropriate route, of either a substance to be screened (test animal), or of a placebo (negative control animal), within a period between  $t_A + 15$  days and  $t_C$ , corresponding to the time when the PrPres level in the spleen of the said laboratory animal is at maximum or within a period between  $t_B$ , corresponding to the time of the first detection of PrPres in the spleen of the said laboratory animal and  $t_C$ ;  $t_B$  being between  $t_A$  and  $t_A + 15$  and  $t_C$  being between  $t_A + 25$  and  $t_A + 30$ ;
- c) sacrificing of the animals within a time interval between  $t_B$  and  $t_C$ , preferably at  $t_C$ , and collecting of the spleen,  $t_A$ ,  $t_B$  and  $t_C$  being expressed in days;
- d) isolation of the PrPres from each spleen collected, according to a suitable method of isolation comprising the homogenization of the spleen, followed by a specific extraction of the PrPres comprising a single separation step, from the homogenate obtained, and optionally the purification of the PrPres;
- e) semiquantification of the PrPres obtained in step (d) by detection of the said PrPres by any appropriate method, producing a specific signal, followed by a comparison of the signal obtained with a calibration series of dilutions of a positive control consisting of a brain homogenate from an animal at the terminal stage of the disease; and
- f) selection of the screened substances as a candidate for the treatment of transmissible subacute

09341539-101299



spongiform encephalopathies, if the PrPres level obtained in the spleen of the test animal, in step e), is reduced by at least a factor of 2 compared with the level obtained under the same conditions with the negative control animal.

a 2. ~~A method~~ Method of screening according to Claim 1, characterized in that in step a) the said NCTA is preferably administered in a buffer suited to the route of administration selected in the form either of a crude tissue, preferably brain, homogenate, or of a PrPres pellet, obtained by appropriate centrifugation, from a crude tissue, preferably brain, homogenate.

3. Method of screening according to Claim 1 or Claim 2, characterized in that in step a) the said NCTA is administered by the intraperitoneal route, at a dose corresponding to an inoculum of NCTA, between 0.001% and 10% (weight/volume), ( $LD_{50}$  between  $10^3$  and  $10^7$ ).

4. Method of screening according to any one of Claims 1 to 3, characterized in that in step d) the said method of isolation is selected such that the ratio: maximum level detectable in the spleen/cut off is greater than 2 or such that a 1/2 dilution of the final sample obtained still provides a detection signal.

5. Method of screening according to any one of Claims 1 to 4, characterized in that in step d) the said method of isolation of the PrPres comprises a separation in a single step.

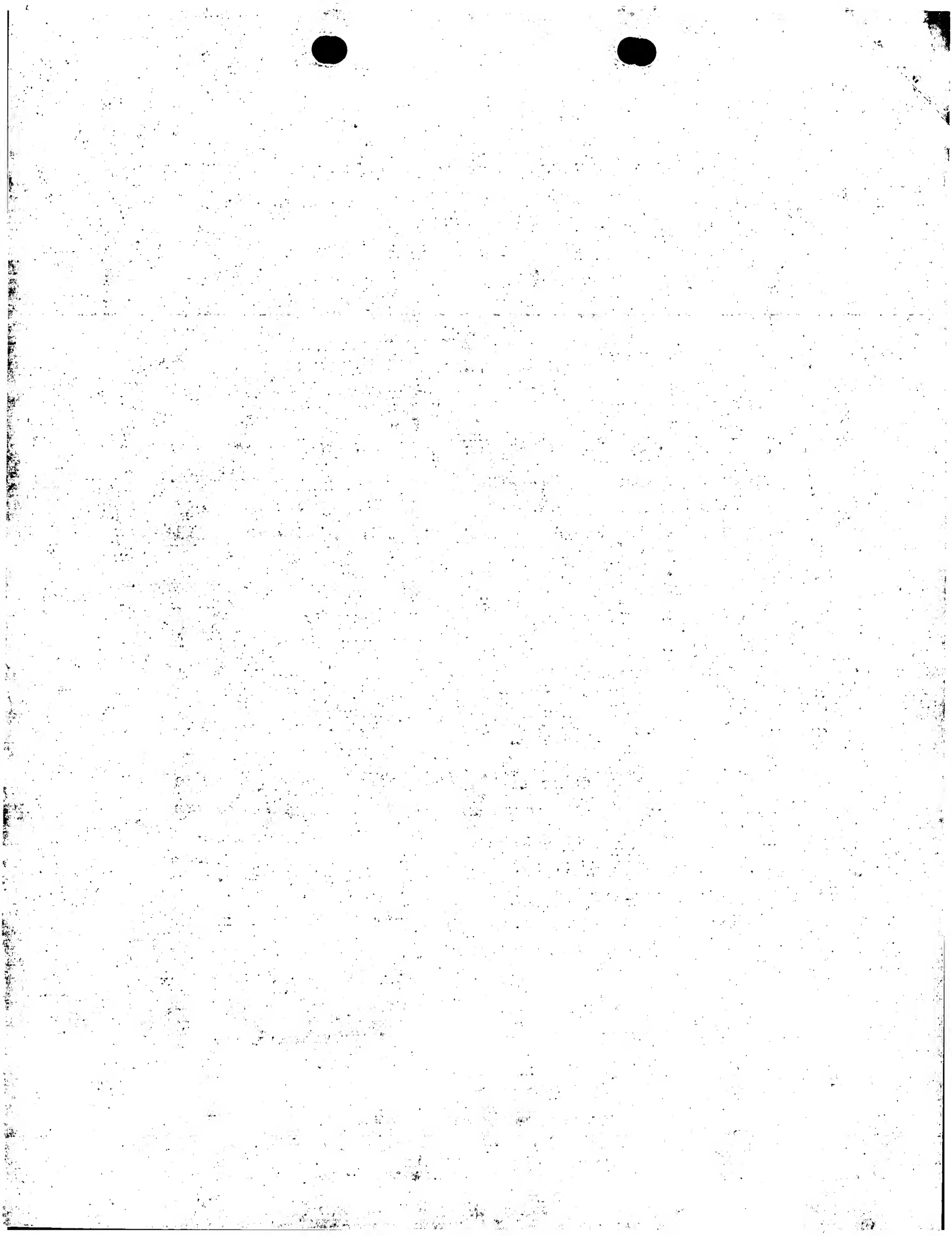
6. Method of screening according to any one of Claims 1 to 4, characterized in that in step e) the PrPres is detected by immunoassay.

7. Method of isolating PrPres, from an organ or a tissue, in particular the spleen or the brain, which is capable of being used in a method according to any one of Claims 1 to 6, characterized in that it comprises essentially the following steps:

(i) homogenization of organ or tissue, collected after sacrificing the animal, by mechanical grinding in a homogenization buffer, followed by

09341539-10299

Sub A1

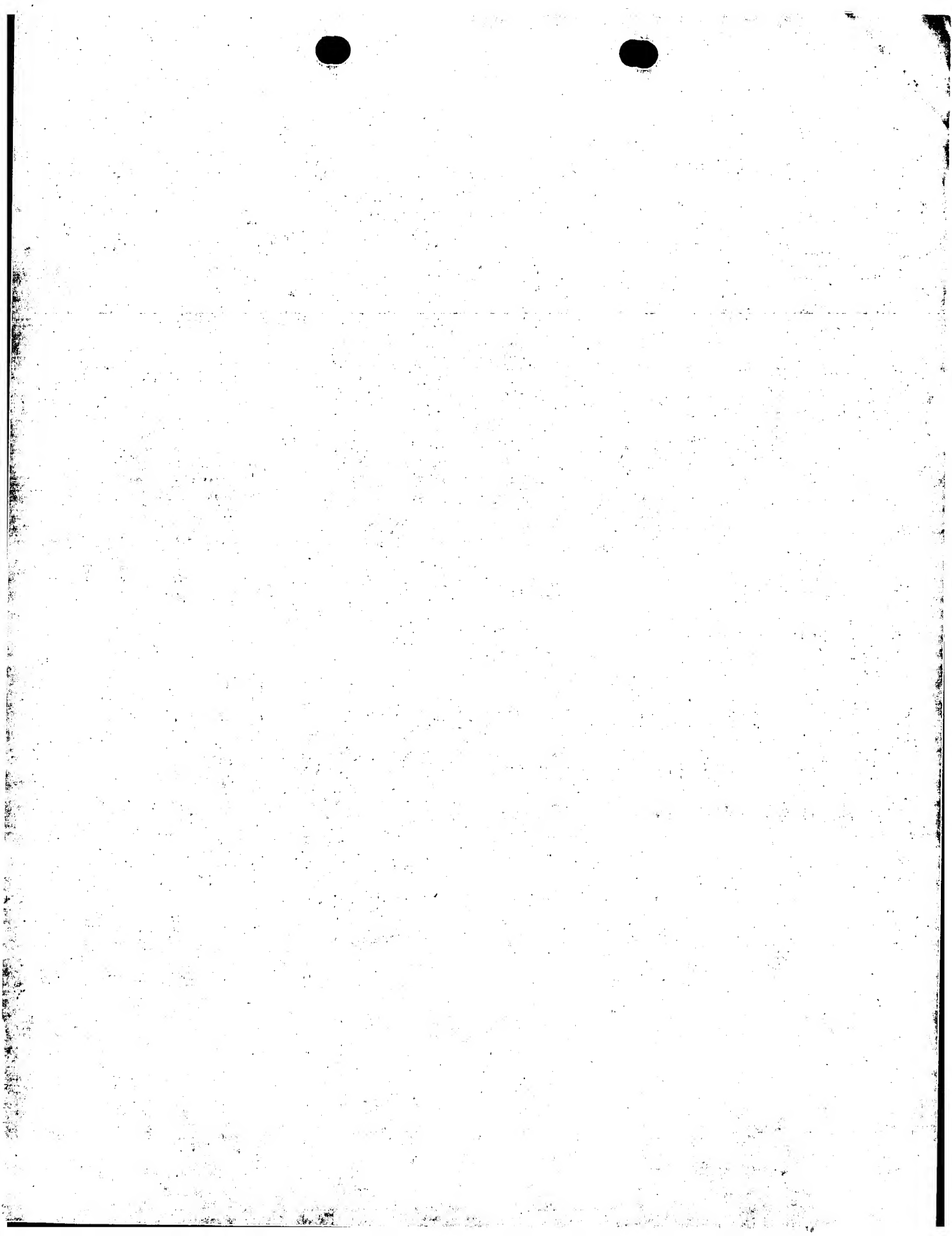


3. (Amended) A [Method] method of screening according to Claim 1 [or Claim 2], characterized in that in step a) the said NCTA is administered by the intraperitoneal route, at a dose corresponding to an inoculum of NCTA, between 0.001% and 10% (weight/volume) ( $LD_{50}$  between  $10^3$  and  $10^7$ ).

4. (Amended) A [Method] method of screening according to [any one of Claims 1 to 3,] Claim 1, characterized in that in step d) the said method of isolation is selected such that the ratio: maximum level detectable in the spleen/cut off is greater than 2 or such that a  $\frac{1}{2}$  dilution of the final sample obtained still provides a detection signal.

5. (Amended) A [Method] method of screening according to [any one of Claims 1 to 4,] Claim 1, characterized in that in step d) the said method of isolation of PrPres comprises a separation in a single step.

6. (Amended) A [Method] method of screening according to [any one of Claims 1 to 4,] Claim 1, characterized in that in step e) the PrPres is detected by immunoassay.



11  
m. x  
09344539-101299  
062701-000000

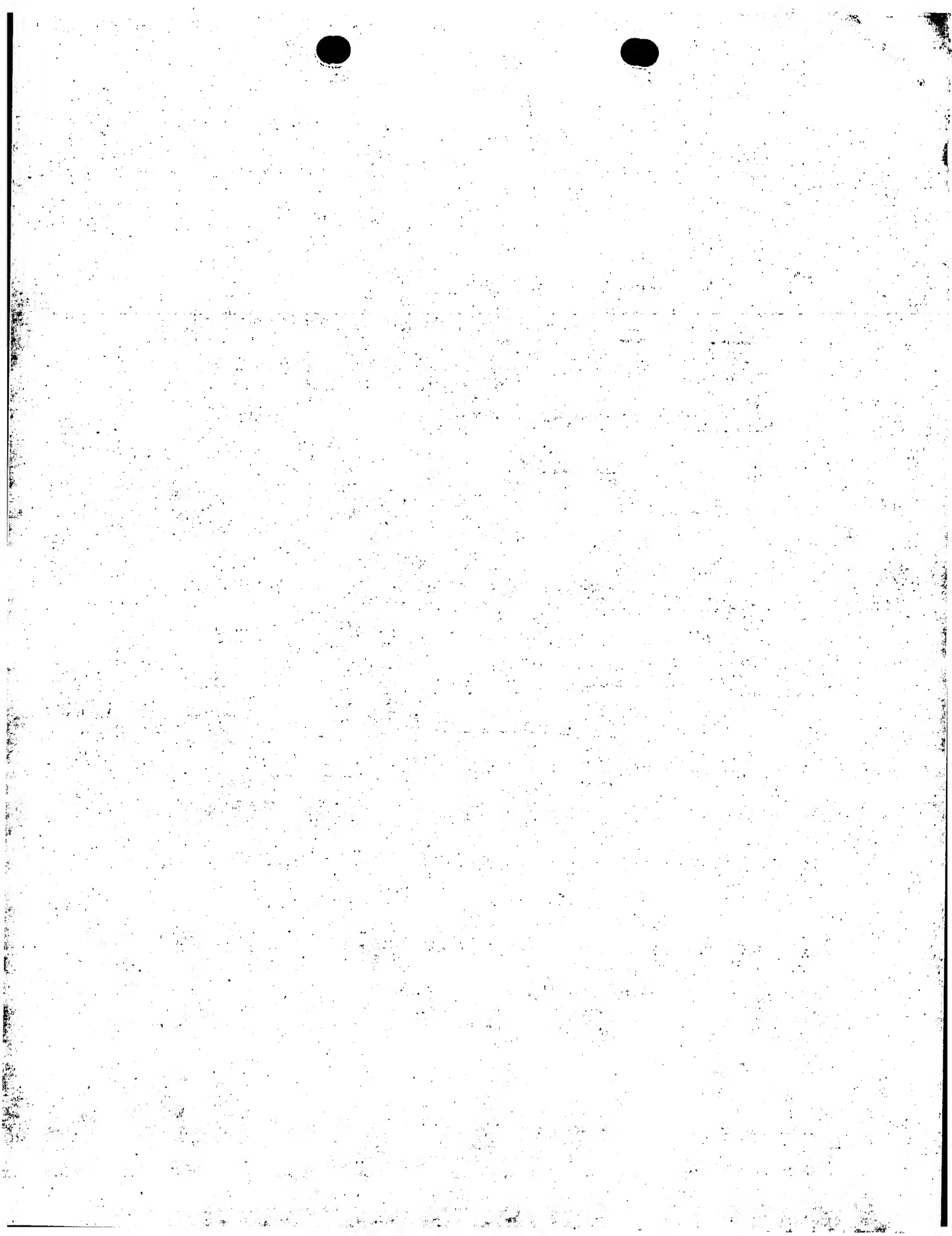
⑦ (Amended) A [Method] method of isolating PrPres, from an organ or a tissue, in particular the spleen or the brain, which is capable of being used in a method according to [any one of Claims 1 to 6,] Claim 1, characterized in that it comprises essentially the following steps:

(i) homogenization of organ or tissue, collected after sacrificing the animal, by mechanical grinding in a homogenization buffer, followed by calibration of the homogenate, for the production of a homogenate comprising, in weight/volume, from 5 to 50% of the said organ or tissue;

(ii) specific extraction of PrPres comprising a single separation step, by treating the homogenate obtained in step (i) by incubating the suspension obtained with a protease and an anionic detergent capable of promoting the aggregation of the PrPres in a suitable buffer and separation of the PrPres, by a single ultracentrifugation at 480,000-1,200,000 g.h, (preferably for 112 R2 2-4 hours) (for example at 240,000- 300,000g for 2 to 4h) (preferably at 20-22°C) of the said suspension, deposited on a buffer cushion having a density of between 1.02 and 1.08, at 20°C.

and recovering the centrifugation pellet comprising the said PrPres; and, if necessary, in 4 h over let, ?

(iii) purification of the PrPres by suspending the centrifugation pellet obtained in (ii) in a Laemmli buffer comprising 1-5% SDS, incubating in this buffer at 100°C for 2-10 minutes and centrifuging at 12,000-15,000 g for 10-15 minutes at 16-22°C.



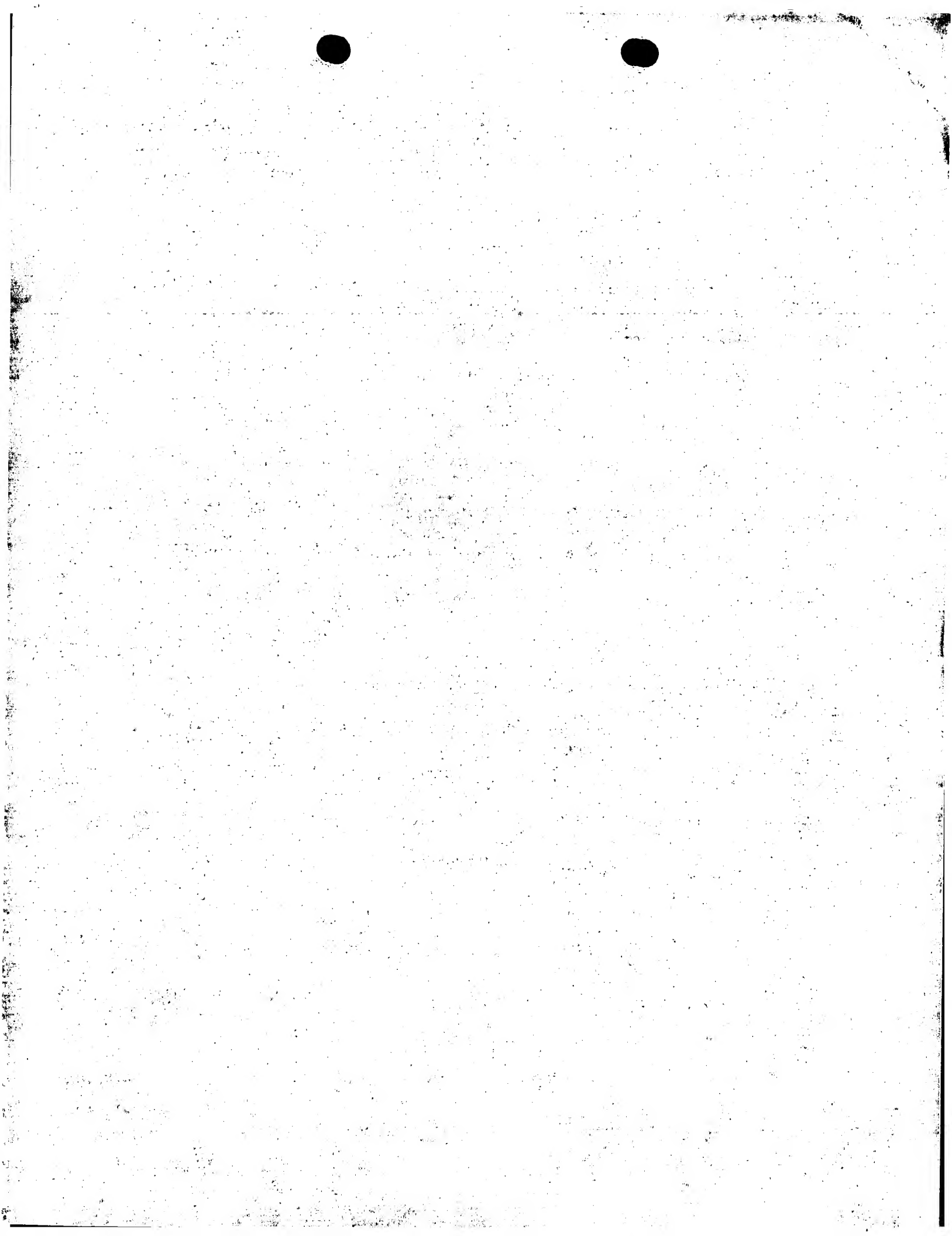


8 (Amended) A [Method] method of isolating PrPres, from an organ or a tissue, in particular the spleen or the brain, which is capable of being used in a method according to [any one of Claims 1 to 6,] Claim 1, characterized in that it comprises essentially the following steps:

(i) homogenization of organ or tissue, collected after sacrificing the animal, by mechanical grinding in a homogenization buffer, followed by the addition, to the homogenate obtained, of a salt having a high ionic strength and capable of promoting the aggregation of the PrPres in a 1:1 (v/v) ratio, followed by calibration of the homogenate, for the production of a homogenate comprising, in weight/volume, from 5 to 50% of the said organ or tissue;

(ii) specific extraction of PrPres by treating the homogenate obtained in step (i) by incubating the suspension obtained with solution comprising a protease and an anionic detergent capable of promoting the aggregation of the PrPres, and a single separation of the PrPres, by centrifugation at 25,000-60,000 g.h, for example at 25,000-30,000 g for 1 to 2 h, preferably at 16-22°C, of the suspension obtained, deposited on a buffer cushion having a density of between 1.02 and 1.08, at 20°C, and recovering the centrifugation pellet comprising the said PrPres; and, if necessary,

(iii) purification of the PrPres by suspending the centrifugation pellet obtained in (ii) in a Laemmli buffer comprising 1-5% SDS, incubating in this buffer at 100°C for 2-10 minutes and centrifuging at 12,000-15,000 g for 10-15 minutes at 16-22°C.



9. (Amended) A [Method] method according to Claim 7 [or 8], characterized in that the homogenization buffer in step (i) is in particular a neutral buffer such as water or an isotonic buffer such as 5% glucose.

10. (Amended) A [Method] method according to Claim 7 [or Claim 8], characterized in that in step (ii), prior to the centrifugation, at least one protease inhibitor is added.

AI 7/10/99  
cm  
1034-101299  
662707-101299  
11. (Amended) A [Method] method according to Claim 7 [or Claim 8], characterized in that in step (ii) the centrifugation is preferably carried out after depositing the suspension containing the PrPres on a 6-20% sucrose cushion.

12. (Amended) A [Method] method according to Claim 8, characterized in that during the extraction step (ii) the solution used for the extraction comprises an anionic detergent capable of promoting the aggregation of the PrPres and a zwitterionic detergent, such as a sulphobetaine, preferably the sulphobetaine SB 3-14 at 1-2%, in a 1:1 (v/v) ratio.

13. (Amended) A [Method] method according to Claim 8, characterized in that in the extraction step (ii) the centrifugation is preferably carried out after depositing the suspension containing the PrPres on a cushion comprising, in a mixture, 6-20% sucrose and a sulphobetaine.



Cancel claim 14.

Please add new claim 15.

A2 --15. A method of detecting the presence of PrPres in an organ or a tissue, comprising isolating PrPres from the organ or tissue in accordance with the method of claim 7, and contacting the isolated PrPres with an antibody capable of specific binding to the PrPres.--

**REMARKS**

No new matter has been introduced by this Preliminary Amendment, and the changes involved are necessary to present proper U.S. English spellings and usage for the intended claims, as well as to eliminate improper multiple dependencies and to provide proper claim format for prosecution in the United States Patent & Trademark Office.

If there are any additional fees due in connection with the filing of this Preliminary Amendment, please charge the fees to our Deposit Account No. 50-0310.

Respectfully submitted

**MORGAN, LEWIS & BOCKIUS LLP**

By: 

Reid G. Adler

Reg. No. 30,988

Dated: July 13, 1999

Customer No. 009629

**MORGAN, LEWIS & BOCKIUS LLP**

1800 M Street, N.W.

Washington, DC 20036

202-467-7000



## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 02 septembre 1998 (02.09.98)	
Demande internationale no PCT/FR98/00063	Référence du dossier du déposant ou du mandataire BLOcp263/26P
Date du dépôt international (jour/mois/année) 14 janvier 1998 (14.01.98)	Date de priorité (jour/mois/année) 14 janvier 1997 (14.01.97)
Déposant DESLYS, Jean-Philippe etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

10 août 1998 (10.08.98)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé Athina Nickitas-Etienne no de téléphone: (41-22) 338.83.38
--	---





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. .tional Application No

PCT/FR 98/00063

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N33/68 C07K14/47 C07K1/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	D. MCKENZIE ET AL.: "Amphotericin B delays both scrapie agent replication and PrP-res accumulation early in infection." JOURNAL OF VIROLOGY., vol. 68, no. 11, November 1994, ICAN. SOCIETY FOR MICROBIOLOGY US, pages 7534-7536, XP002042242 see the whole document	1-14
X	US 5 276 059 A (B. CAUGHEY ET AL.) 4 January 1994 see abstract; claims	1
A	see column 5, line 55 - column 6, line 44 -/--	2-14

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 May 1998

Date of mailing of the international search report

04/06/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Griffith, G



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.

PCT/FR 98/00063

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>S. SAKAGUCHI ET AL.: "Accumulation of proteinase K-resistant prion protein (PrP) is restricted by the expression level of normal PrP in mice inoculated with a mouse-adapted strain of the Creutzfeldt-Jakob disease agent."  JOURNAL OF VIROLOGY.,  vol. 69, no. 12, December 1995, ICAN  SOCIETY FOR MICROBIOLOGY US,  pages 7586-7592, XP002042243  see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-14
A	<p>WO 93 23432 A (NEW YORK UNIVERSITY ET AL.)  25 November 1993  see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-14
A	<p>R. B. PETERSEN ET AL.: "Effect of the D178N mutation and the codon 129 polymorphism on the metabolism of the prion protein."  JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY.,  vol. 271, no. 21, 24 May 1996, MD US,  pages 12661-12668, XP002042244  see the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-14



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In ternational Application No

PCT/FR 98/00063

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5276059	A	04-01-1994	AU 4678193 A	31-01-1994
			WO 9401116 A	20-01-1994
WO 9323432	A	25-11-1993	AU 4376093 A	13-12-1993



## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 G01N33/68 C07K14/47 C07K1/14

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 G01N C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	D. MCKENZIE ET AL.: "Amphotericin B delays both scrapie agent replication and PrP-res accumulation early in infection." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 68, no. 11, novembre 1994, ICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY US, pages 7534-7536, XP002042242 voir le document en entier	1-14
X	US 5 276 059 A (B. CAUGHEY ET AL.) 4 janvier 1994 voir abrégé; revendications	1
A	voir colonne 5, ligne 55 - colonne 6, ligne 44. --- -/--	2-14



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité, et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&amp;" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

22 mai 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

04/06/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2,  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Griffith, G





C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	S. SAKAGUCHI ET AL.: "Accumulation of proteinase K-resistant prion protein (PrP) is restricted by the expression level of normal PrP in mice inoculated with a mouse-adapted strain of the Creutzfeldt-Jakob disease agent." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 69, no. 12, décembre 1995, ICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY US, pages 7586-7592, XP002042243 voir le document en entier ----	1-14
A	WO 93 23432 A (NEW YORK UNIVERSITY ET AL.) 25 novembre 1993 voir le document en entier ----	1-14
A	R. B. PETERSEN ET AL.: "Effect of the D178N mutation and the codon 129 polymorphism on the metabolism of the prion protein." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 21, 24 mai 1996, MD US, pages 12661-12668, XP002042244 voir le document en entier -----	1-14



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/00063

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5276059	A	04-01-1994	AU 4678193 A	31-01-1994
			WO 9401116 A	20-01-1994
WO 9323432	A	25-11-1993	AU 4376093 A	13-12-1993



## Cadre III TEXTE DE L'ABREGE (suite du point 5 d la première feuille)

Méthode de criblage de substances, susceptibles d'avoir une action thérapeutique dans le traitement des encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST) ou maladies dites à prions, qui comprend une étape d'isolement de la PrPres, à partir de la rate; procédés d'isolement de la PrPres, particulièrement adaptés à ladite méthode de criblage ainsi que leurs applications, notamment dans la détection de la PrPres.



PCT

NOTIFICATION DU NUMÉRO DE LA DEMANDE INTERNATIONALE ET DE LA DATE DU DÉPÔT INTERNATIONAL

(règle 20.5.c) du PCT)

Demande internationale n° <b>PCT/FR98/00063</b>	Expéditeur : L'OFFICE RÉCEPTEUR  Destinataire : • <b>Cabinet Ores</b> <b>6 Avenue de Spéville</b> <b>75008 Paris</b>
Date du dépôt international (jour/mois/année) <b>14 janvier 1998</b>	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire <b>Bloc 263 / 264</b>	
Date d'expédition (jour/mois/année) <b>18 février 1998</b>	

NOTIFICATION IMPORTANTE	Date de priorité (jour/mois/année) <b>14 janvier 1997</b>
Déposant <b>Commissariat à l'énergie atomique</b>	
Titre de l'invention <b>Méthode de criblage de substances à action thérapeutique</b>	

- Il est notifié au déposant que le numéro de demande internationale et la date de dépôt international indiqués plus haut ont été attribués à la demande internationale.
- Il est également notifié au déposant que l'exemplaire original de la demande internationale
  - ☒ a été transmis au Bureau international le **16 février 1998**
  - ☐ n'a pas encore été transmis au Bureau international pour la raison indiquée ci-dessous et une copie de la présente notification a été envoyée au Bureau international\*
  - ☐ parce que l'autorisation relative à la défense nationale n'a pas encore été obtenue.
  - ☐ parce que (explication) :

\* Le Bureau international surveille la transmission de l'exemplaire original par l'office récepteur et en notifiera la réception au déposant (au moyen du formulaire PCT/IB/301). Au cas où l'exemplaire original ne lui serait pas parvenu à l'expiration d'un délai de 14 mois à compter de la date de priorité, le Bureau international en aviserait le déposant (règle 22.1c)).

Nom et adresse postale de l'office récepteur <b>Institut National de la Propriété Industrielle</b> <b>26 bis, rue de Saint-Petersbourg - 75800 Paris Cedex 08</b>  n° de télécopieur : <b>01 42 94 27 99</b>	Affaire suivie par :  <b>PICAUD</b>  n° de téléphone :
--	--





V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement Kc

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	12	YES
	Claims	1-11, 13, 14	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1: D. MCKENZIE ET AL.: "Amphotericin B delays both scrapie-agent replication and PrP-res accumulation early in infection". JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 68, no. 11, November 1994, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY US, pages 7534-7536.

D2: US-A-5 276 059.

1. Document D1 discloses the determination of the effects of treatment with amphotericin of hamsters suffering from scrapie. The animals are inoculated with a homogenate of the brain of scrapie-infected hamsters (263K strain). This step is followed by the administration of amphotericin B (or not, in the case of the control animals). AmB is administered in a dosage of 1 mg/kg, for 6 or 7 days, the first day being the day following inoculation. The animals are sacrificed 4, 5, 6, 8 and 10 weeks after inoculation.

In order to determine the effect of AmB, one of the methods used is the removal of the brain and the determination of PrPres.



The accumulation of AmB in the treated animals is reduced by a factor of 5 to 25 in relation to the control animals, 4 to 6 weeks after inoculation (see page 7535, left-hand column, last line to right-hand column, first paragraph).

Therefore, said document discloses a method for determining the effect of a substance 4 weeks (28 days) after inoculation.

The method of the present Claim 1 enables the effect to be determined between  $t_b$  ( $t_a - t_a+15$ ) and  $t_c$  ( $t_a+20 - t_a+30$ ), i.e., for example 30 days after inoculation.

Therefore, the method disclosed in D1 differs from the method of the present Claim 1 by the detection of PrPres in the spleen.

*spleen*

The problem which the present invention aims to solve can therefore be considered to be an alternative method.

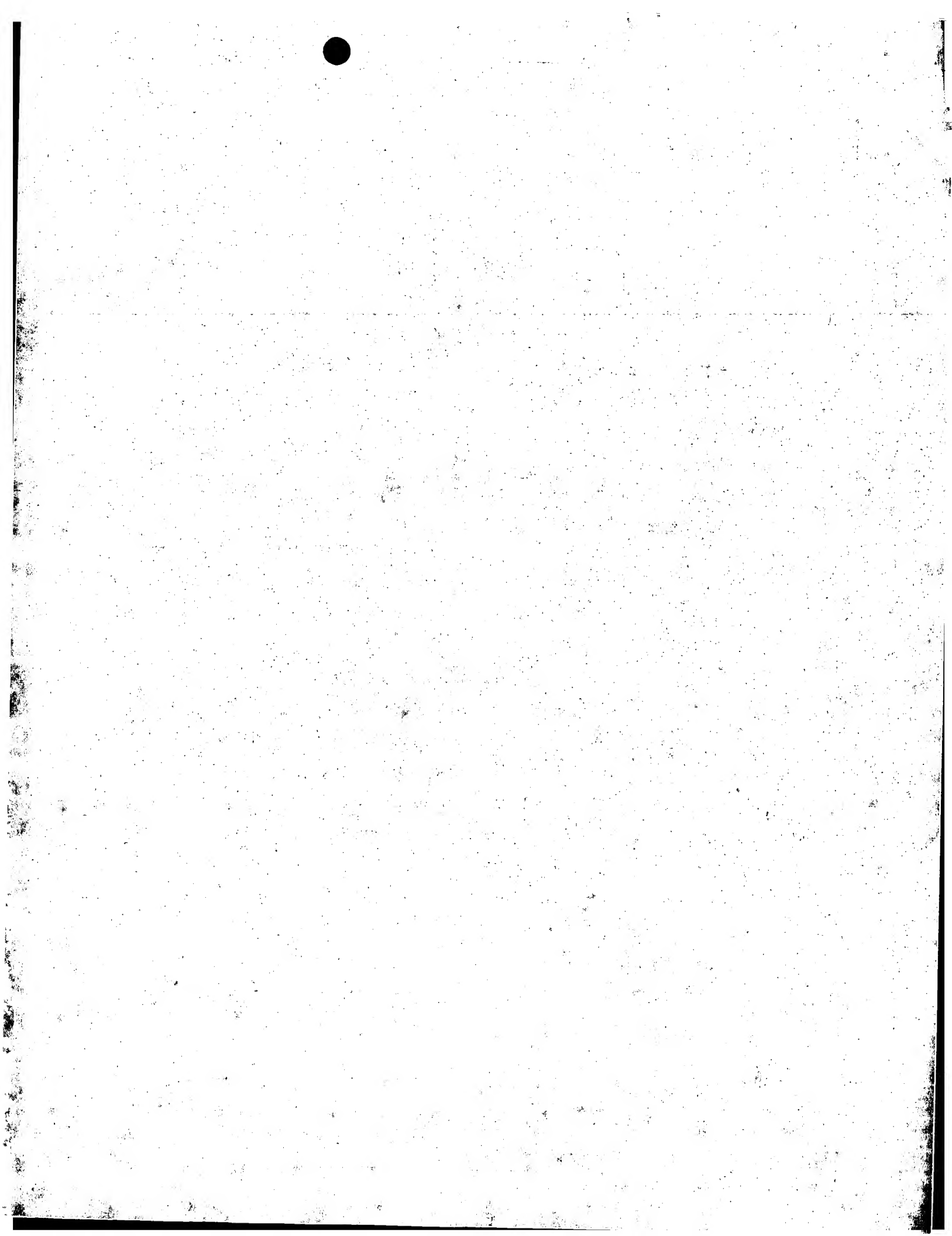
However, for a person skilled in the art, it would be obvious that the spleen can also be used for the same purpose as in (D2). This document discloses the use of a substance (Congo Red) for the treatment of, e.g. scrapie in mice. The effect of the

*5276059*

administration of Congo Red is determined by the following method: the animals are inoculated with a homogenate of the brain of scrapie-infected mice; six hours later, administration of Congo Red is begun; after five weeks (35 days), the animals are sacrificed and the rate of PrPres in the spleen is determined; the treated animals have a rate which is 87% lower than that of the control animals (see Column 11, "effect of... in scrapie-infected mice").

In conclusion, D2 discloses the use of the rate of PrPres to determine the therapeutic potential of a





substance. Indeed, the method claimed in Claim 1 differs therefrom only by the time of removal of the spleen.

In Claim 1, reference is made to the method for isolating PrPres from the spleen. However, suitable methods are already known. Therefore, this feature does not make the subject matter of the claim inventive.

Consequently, it appears that the subject matter of Claim 1 lacks inventive step (PCT Article 33(3)).

Dependent Claims 2 to 6 do not contain any feature which, in combination with those of any of the claims to which they refer, defines a subject matter which meets the PCT requirements with respect to inventive step (PCT Article 33(3)), since the features of these claims are already disclosed in D1.

- with dependent*
2. None of the documents cited in the international search report discloses a method for isolating PrPres as per Claims 7 and 8. Consequently, the subject matter of Claims 7, 8, 14 and of dependent Claims 9 to 13 is novel over the search report citations (PCT Article 33(2)).

Document D1, which is considered the closest prior art, discloses a method for isolating PrPres from the brain, including the step of homogenising the tissue at 20% in a buffer and incubating it with a solution containing proteinase K, laurylsarcosine and 10% NaCl (see page 7535, right-hand column). The isolated PrPres is detected by immunoblot.



D1 does not disclose centrifugation conditions. It is however obvious that a separation step is included in the method before the electrophoresis step.

The problem which the subject matter of Claims 7 and 8 proposes to solve can therefore be considered to be that of improving the method for isolating the PrPres.

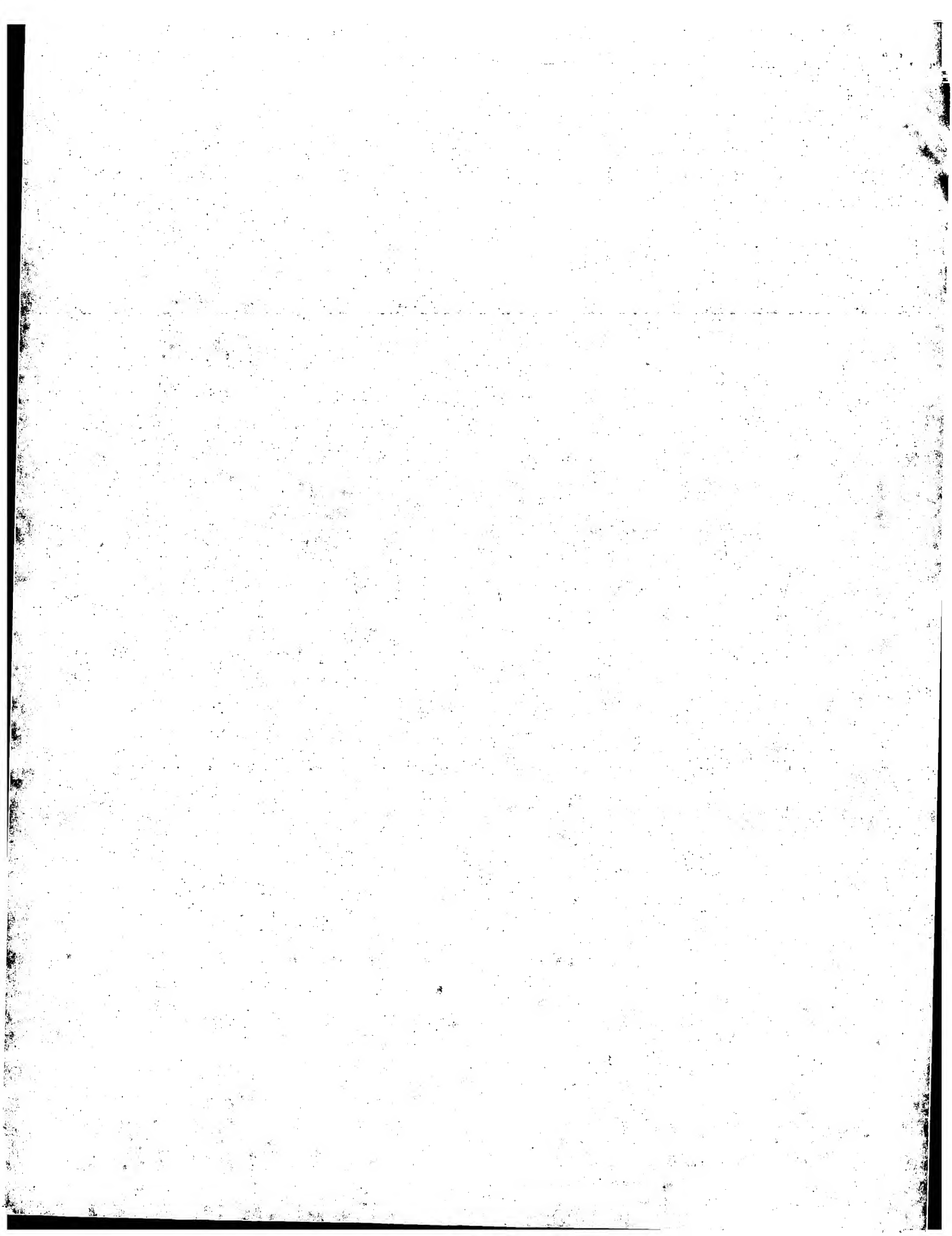
The solution contained in Claims 7 and 8 comprising optimising centrifugation conditions, which appears to be standard practice for a person skilled in the art. Step (iii) in Claims 7 and 8 is optional and has no limiting effect on the scope of the claims (see VIII.1).

Consequently, the subject matter of Claims 7, 8 and 14 does not appear to involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

Dependent Claims 9 to 11 and 13 do not contain any feature which, in combination with those of any of the Claims to which they refer, defines a subject matter which meets the PCT requirements with respect to inventive step (PCT Article 33(3)).

The extraction solution in the method of Claim 12 includes an anionic detergent and a zwitterionic detergent. This selection results in a higher isolation rate (Figure 6 of the application).

Therefore, it appears that the subject matter of Claim 12 involves an inventive step (PCT Article 33(3)).

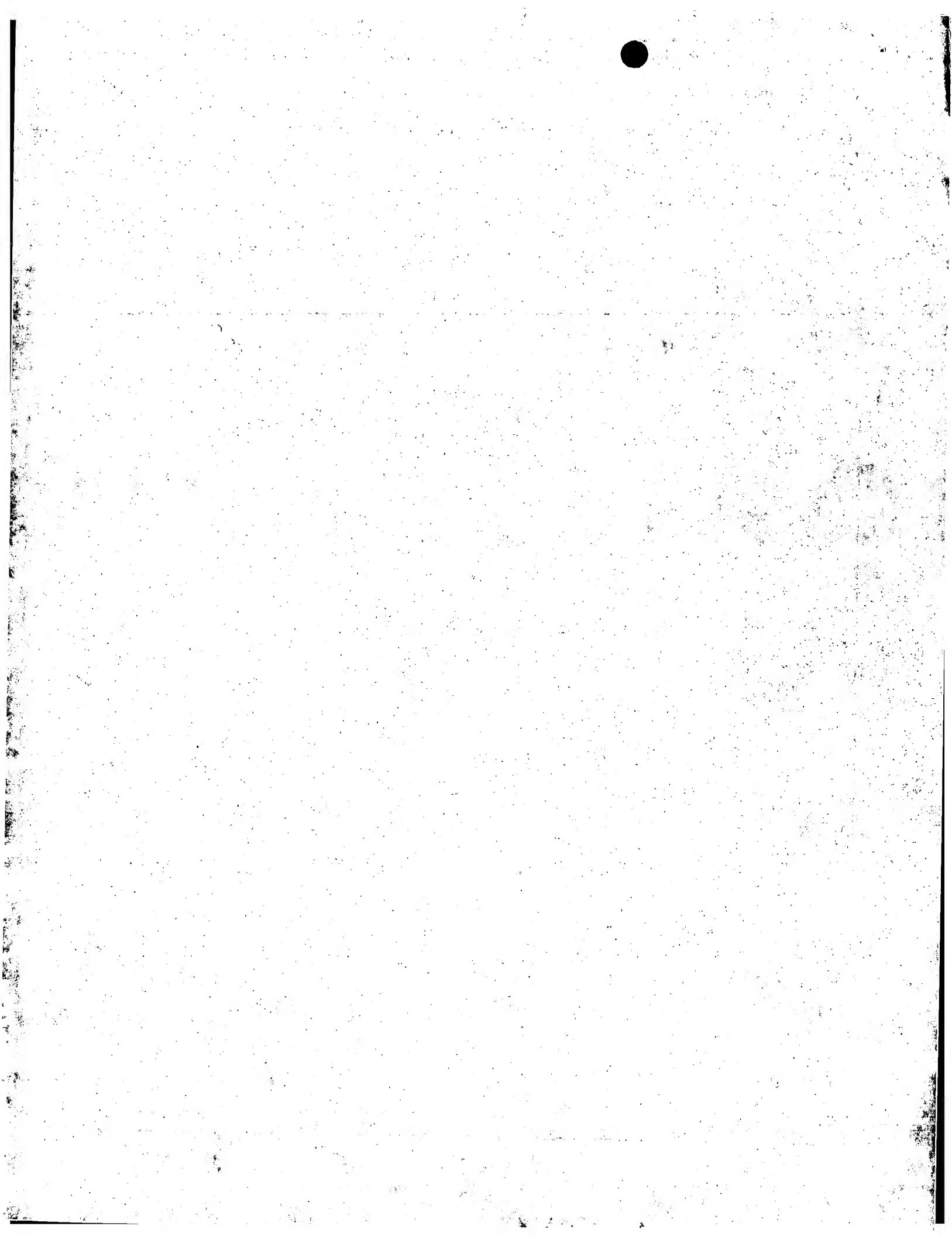




**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not outline the relevant prior art set forth in documents D1 and D2 and does not cite these documents.



**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. The terms "preferably", "optionally", "for example", "essentially contains" and "such as", used in Claims 1, 2, 7 to 9 and 11 to 13 are vague and ambiguous, and leave a doubt as to the meaning of the technical features to which they refer. the subject matter of said Claims has therefore not been clearly defined (PCT Article 6).

In Claims 7 and 8, for instance, the use of the expression "and, if necessary" means that step (iii) of the method is entirely optional.

2. Claim 3 is unclear owing to the use of an expression between brackets.





## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<b>(51) International Patent Classification<sup>5</sup> :</b> C07K 13/00, 15/12, 15/28 C12Q 1/02	<b>A1</b>	<b>(11) International Publication Number:</b> WO 93/23432 <b>(43) International Publication Date:</b> 25 November 1993 (25.11.93)
<b>(21) International Application Number:</b> PCT/US93/04600 <b>(22) International Filing Date:</b> 14 May 1993 (14.05.93)	<b>(74) Agent:</b> TOWNSEND, G., Kevin; Browdy and Neimark, 419 Seventh Street, N.W., Ste. 300, Washington, DC 20004 (US).	
<b>(30) Priority data:</b> 883,875 15 May 1992 (15.05.92) US	<b>(81) Designated States:</b> AU, CA, JP, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
<b>(71) Applicants:</b> NEW YORK UNIVERSITY [US/US]; 550 First Avenue, Room MSB-153, New York, NY 10016 (US). INSTITUTO NAZIONALE NEUROLOGICO C. BESTA [IT/IT]; Via Celoria, 11, I-20133 Milano (IT).	<b>Published</b> <i>With international search report.</i>	
<b>(72) Inventors:</b> TAGLIAVINI, Fabrizio ; Via Pascoli, 18, I-20129 Milano (IT). FRANGIONE, Blas ; 343 East 30 Street, New York, NY 10016 (US).		
<b>(54) Title:</b> SOLUBLE PRION POLYPEPTIDES, AND METHODS FOR DETECTING AND PURIFYING THEREOF		
<b>(57) Abstract</b>		
<p>Novel soluble prion polypeptides occurring <i>in vivo</i>, and methods of making and using thereof. Diagnostic methods are also provided having both generality and rapidity for the identification of soluble infectious or normal prion polypeptides in animal or human subjects which provide a diagnosis as to present or future prion-related pathologies, which methods provide relatively simple and commercially useful diagnostic assays which can be applied in the field or in the laboratory for the detection of prion infection in livestock and humans.</p>		

**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	FR	France	MR	Mauritania
AU	Australia	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	United Kingdom	NL	Netherlands
BE	Belgium	GN	Guinea	NO	Norway
BF	Burkina Faso	GR	Greece	NZ	New Zealand
BG	Bulgaria	HU	Hungary	PL	Poland
BJ	Benin	IE	Ireland	PT	Portugal
BR	Brazil	IT	Italy	RO	Romania
CA	Canada	JP	Japan	RU	Russian Federation
CF	Central African Republic	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CG	Congo	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CH	Switzerland	KZ	Kazakhstan	SK	Slovak Republic
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SU	Soviet Union
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	TD	Chad
CZ	Czech Republic	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Germany	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Denmark	ML	Mali	US	United States of America
ES	Spain	MN	Mongolia	VN	Viet Nam
FI	Finland				

SOLUBLE PRION POLYPEPTIDES, AND METHODS FOR  
DETECTING AND PURIFYING THEREOF

BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention

5 The invention in the field of molecular and cell biology relates to novel soluble prion polypeptides occurring in vivo, and to methods of making and using thereof.

Background of Related Art

10 The cellular prion protein (PrP<sup>c</sup>) is a sialoglycoprotein encoded by a gene that in humans is located on chromosome 20 (Oesch, B. et al. Cell 40:735-746 (1985); Basler, K. et al. 46:417-428 (1986); Liao, Y.J. et al. Science 233:364-367 (1986); Meyer, R.K. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2310-2314 (1986); Robakis, N.K. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 140:758-765 (1986); Sparkes, R.S. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7358-7362 (1986); Bendheim, P.E. et al. J. Infect. Dis. 158:1198-1208 (1988); Turk, E. et al. Eur. J. Biochem. 176:21-30 (1988)). The PrP gene is expressed in neural and non-neural tissues, the highest concentration of mRNA being  
20 in neurons (Chesebro, B. et al. Nature 315:331-333 (1985); Kretzschmar, H.A. et al. Am. J. Pathol. 122:1-5 (1986); Brown, H.R. et al. Acta Neuropathol. 80:1-6 (1990); Cashman, N.R. et al. Cell 61:185-192 (1990); Bendheim, P.E. Neurology 42:149-156 (1992)).

25 The translation product of the PrP gene consists of 253 amino acids in humans (Kretzschmar, H.A. et al. DNA 5:315-324 (1986); Pucket, C. et al. Am. J. Hum. 49:320-329 (1991)), 254 in hamster and mice or 256 amino acids in sheep and undergoes several post-translational modifications. In hamsters, a signal  
30 peptide of 22 amino acids is cleaved at the N-terminus, 23 amino acids are removed from the C-terminus on addition of a glycosyl phosphatidylinositol (GPI) anchor, and asparagine-linked oligosaccharides are attached to residues 181 and 197 in a loop formed by a disulfide bond (Turk, E. et al. Eur. J. Biochem. 176:21-30 (1988); Hope, J. et al. EMBO J. 5:2591-2597 (1986); Stahl, N. et al. Cell 51:229-240 (1987); Stahl, N. et al. Biochemistry 29:5405-5412 (1990); Safar, J. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6377 (1990)).

In prion-related encephalopathies, such as Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease humans (GSS) of humans, scrapie of sheep and goats, and spongiform encephalopathy of cattle, PrP<sup>c</sup> is converted into an altered form designated PrP<sup>Sc</sup>, that is distinguishable from PrP<sup>c</sup> because only the N-terminal 67 amino acids are removed by proteinase K digestion under conditions in which PrP<sup>c</sup> is completely degraded (Oesch B. et al. Cell 40:735-746 (1985); Bolton, D.C. et al. Science 218:1309-1311 (1982); McKinley, M.P. et al. Cells 35:57-62 (1982); Bolton, D.C. et al. Biochemistry 23:5898-5905 (1984); Prusiner, S.B. et al. Cell 38:127-134 (1984); Bolton, D.C. et al. Arch. Biochem. Biophys. 258:1515-22 (1987)).

Several lines of evidence suggest that PrP<sup>Sc</sup> may be a key component of the transmissible agent responsible for prion-related encephalopathies (Prusiner, S.B. Science 252:1515-22 (1991) and it has been established that its protease-resistant core is the major structural protein of amyloid fibrils that accumulate intracerebrally in some of these conditions (Brendheim, P.E. et al. Nature 310:418-421 (1984); DeArmond, S.J. et al. Cell 41:221-235 (1985); Kitamoto, T. et al. Ann. Neurol. 20:204-208 (1986); Robert, G.W. et al. N. Engl. Med. 315:1231-1233 (1986); Ghetti, B. et al. Neurology 39: 1453-1461 (1989); Tagliavini, F. et al. EMBO, J. 10:513-519 (1991); Kitamoto, T. et al. Neurology 41:306-310 (1991)).

PrP<sup>c</sup> is a membrane-bound protein, anchored to the cell surface membrane through the GPI moiety (Stahl, N. et al. Cell 51:229-240 (1987); Stahl, N. et al. Biochemistry 29:8879-8884 (1990); Stahl, N. et al. Biochemistry 29:5405-5412 (1990); Safar, j. et al. J. Infec. Dis. 163:488-494 (1991). Nevertheless, a secretory form of the molecule, in addition to the membrane form, has been found in cell-free translation systems supplemented with microsomal membranes.

PrP<sup>c</sup> is secreted from *Xenopus* oocytes injected with PrP mRNA synthesized in vitro (Hay, B. et al. Biochemistry 26:8110-8115 (1987)). PrP<sup>c</sup> is spontaneously released from normal and scrapie-infected murine neuroblastoma cells, and from mouse C127 cells transfected with the PrP gene cloned from scrapie-infected



mouse brain (Caughey, B. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4757-4661 (1988); Caughey, B. et al. J. Virol. 63:175-181 (1989); Borchelt, D.R. et al. J. Cell. Biol. 110:743-752 (1990)).

5 A secretory form of PrP in addition to a transmembrane form can be generated in cell-free translation systems supplemented with microsomal membranes. The secretory form predominates in the rabbit reticulocyte lysate system, whereas the transmembrane form prevails in the wheat germ system, the alternative topology being controlled by a stop-transfer effector domain (Prusiner, S.B. 10 Nature 310:418-421 (1984); Hay, B. et al. Biochemistry 26:8110-8115 (1987); Hay B. et al. Mol. Cell. Biol. 7:914-920 (1987); Lopez, C.d. et al. Science 248:226-229 (1990); Yost, C.S. et al. Nature 343:669-672 (1990)).

Inoculation of CSF from patients with Creutzfeldt-Jakob 15 disease and animals with natural or experimental scrapie induces a spongiform encephalopathy in the recipient animal (Brown, P. Epidemiol. Rev. 2:113-135 (1989). Non-GPI-linked, C-terminal-truncated molecules have been isolated from scrapie-infected hamster brains (Stahl, N. et al. Biochemistry 29:8879-8884 20 (1990). GPI-linked PrP<sup>Sc</sup> accumulates within cytoplasmic vesicles of cultured cells instead of being exported to the plasma membrane (Taraboulos, A. et al. J. Cell. Biol. 110:2117-2132 (1990).

Sequencing studies of C-terminal peptides derived from 25 enzymatic digestion of PrP<sup>Sc</sup> purified from scrapie-infected hamster brains have shown that approximately 15% of the molecules do not contain the GPI anchor and are truncated at the C-terminus, ending at Gly228 rather than at Ser231 (Stahl, N. et al. Biochemistry 29:8879-8884). It is likely that such 30 truncation at Gly228 renders the prion hamster PrP<sup>Sc</sup> soluble in vitro, but such truncated scrapie proteins have not been found to exist in vivo in a substantially soluble form. Soluble forms of any prion proteins have thus not been demonstrated in vivo or in situ.

35 Accordingly, the lack of a soluble form of prion polypeptides makes impractical the routine screening of animals or humans for normal or pathogenic prion expression, such that tissues (e.g., as brain) need to be biopsied to determine the

pathogenesis. If prion proteins could be reliably assayed, it could conceivably be decades before neurological symptoms begin to occur. However, as biopsy is the only known means of detection, testing is not provided usually until  
5 neurodegenerative symptoms begin.

Therefore, a need exists to provide alternative detection methods for prion proteins in animals or humans for diagnosing present or potential prion related infection or pathogenesis.

10

#### SUMMARY OF THE INVENTION

It is an object of the present invention to overcome the deficiencies of the related art.

It is also an object of the present invention to provide novel diagnostic methods having both generality and  
15 rapidity for the identification of soluble prion polypeptides in animal or human subjects which provide a diagnosis as to present or future prion-related pathologies, which methods provide relatively simple and commercially useful diagnostic assays which can be applied in the field or in the laboratory for the  
20 detection of prion infection in livestock and humans.

It is also an object of the present invention to provide novel prion polypeptides which can be found *in vivo* which are in substantially soluble form as soluble prion polypeptides which are capable of being detected in body tissues, preferably  
25 blood or cerebrospinal fluid.

It is a further object of the present invention to provide methods for detecting soluble prion polypeptides in a sample, such as a tissue sample of an animal or human subject.

Another object of the present invention is to provide  
30 a method for purifying a soluble prion polypeptide from a sample, such as a tissue sample from an animal or a human subject.

Another object of the present invention is to provide for the identification of soluble prion polypeptides which are structurally or functionally related to known prion proteins  
35 which, however, are not known to be in substantially soluble form *in vivo* or *in situ*.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 represents an immunoblot analysis of CSF fraction P2p showing a broad band with electrophoretic mobility of 33-37 kDa (arrows) that is strongly labeled by the antiserum anti-PrPN (lane a). The immunoreactivity is abolished by absorption of the antiserum with the relevant peptide (lane b). Protein bands still immunoreactive after absorption were regarded as nonspecific. Molecular weight markers (expressed in kDa) are shown to the left. 15% polyacrylamide minigel; antisera dilutions: 1:500.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

It has now been unexpectedly discovered that prion polypeptides are expressed in soluble form in animal or human body tissues, such as cerebrospinal fluid, so that detection or diagnosis of prion infected or expressing animals or humans can be performed on a commercial and medically significant scale to avoid or prevent further prion infection among animals or humans, such as for livestock inspection prior to slaughtering, and for diagnosis of prion infection in humans or animal subjects.

According to one aspect of the present invention, a soluble prion polypeptide has been discovered which has an amino acid sequence substantially corresponding to a soluble prion protein selected from a PrP<sup>C</sup>, a PrP or a PrP<sup>Sc</sup> prion protein which are apparent isoforms of a prion protein having different post-translational modifications. In vivo soluble forms of these prion proteins were heretofore unknown and unexpected, due to the formation of prion aggregates of the pathogenic PrP and/or PrP<sup>Sc</sup> forms, as well as the high hydrophobic and/or aggregation proteins of these isoforms, which are known to occur only associated with cell membranes, such as bound to the GPI anchor, or associated with or incorporated into vesicles.

In the context of the present invention, an *in vivo* soluble prion polypeptide refers to a prion polypeptide corresponding to known insoluble prion proteins, but which insoluble prion polypeptide has been rendered soluble such that if it is found intercellularly or intracellularly and not in association with membranes, vesicles, aggregates or

phospholipids. Accordingly, such newly discovered soluble prion polypeptides are found in soluble form *in vivo*, or under physiological conditions, in various tissues, such as the non-limiting examples of cerebrospinal fluid (CSF), blood, serum and lymph.

Accordingly, the present invention resides in the discovery of *in vivo* soluble isoforms or derivatives of prion proteins, which are found to be present in various tissues of animals and humans, and which provide a means for detecting pathogenic or normal isoforms of prion proteins as *in vivo* soluble polypeptides present in human or animal tissues or soluble extracts thereof.

In one embodiment, the present invention is directed to a naturally occurring soluble prion polypeptide substantially free from impurities of human origin with which it is natively associated. "Substantially free of other proteins" indicates that the protein has been purified away from at least 90 per cent (on a weight basis), or from even at least 99 per cent, if desired, of other proteins and glycoproteins with which it is natively associated. Purification of such soluble prion polypeptides of the present invention can be achieved by subjecting the cells, tissue or fluids containing the soluble prion polypeptide to protein purification techniques such as immunoabsorbent columns bearing monoclonal or polyclonal antibodies reactive against the protein. Alternatively, the purification can be achieved by a combination of standard methods, such as ammonium sulfate precipitation, molecular sieve chromatography, and ion exchange chromatography.

It will be understood that a soluble prion polypeptide of the present invention can be purified biochemically or physicochemically from a variety of cell or tissue sources of animals or humans. For preparation of naturally occurring soluble prion polypeptide, tissues such as cerebral spinal fluid, blood, urine or lymph are preferred. However, by routine experimentation it can be determined whether such soluble prion proteins accumulate in any given tissue.

Prion polypeptides of the present invention include polypeptides having amino acid sequences which substantially

correspond to known prion protein sequences, such as those for PrP, PrP<sup>C</sup> and PrP<sup>Sc</sup>, of animal or human origin, but which are in substantially in vivo soluble form, due to C-terminal truncation, modification or alternative folding after synthesis. In the context of the present invention, the term "C-terminus" of a prion protein refers to amino acids 127-253, and more preferably, amino acids 228-253 of a known prion protein. The amino acid and nucleic acid sequences of non-soluble prion proteins are known in the art, and such published sequences are herein entirely incorporated by reference, including all sequences and figures, which references include, but are not limited to, Oesch et al. Cell, 40:735-746 (1985); Basler et al. Cell, 46:417-428 (1986); Kretzschmar et al DNA, 5:314-324 (1986); Liao et al. Science, 233:364-367 (1986); Loch et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 8:6372-6376 (1986); Goldmann et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 87:2476-2480 (1990); Puckett et al Am. J. Hum. Genet., 49:320-329 (1991). These sequences, as described above, include prion proteins from different mammalian species having substantial homology. All of the prion sequences are commonly numbered 1-253 as the initially translated, and undergo subsequent post-translational modifications to become the various forms, e.g., as normal PrP<sup>C</sup> or abnormal or infectious PrP<sup>Sc</sup> and/or PrP. Human prion sequences are known to have 253 amino acids, which the C-terminus may be cleaved when Ser231 is bound to GPI. Accordingly, the common 253 numbering system described herein will use this 253 amino acid residue designation, and additional amino acid residues, such as 254 in hamster or 256 in sheep will be so designated.

C-terminal modifications of insoluble prion polypeptides of the present invention include, but are not limited to C-terminal truncations selected from a truncation selected from truncation at prion amino acid 228, 229, 230 or 231; prion amino acids 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250 or prion amino acids 251, 252, 253, 254, 255, 256.

The C-terminal modifications which make the insoluble protein in vivo soluble also include C-terminal modifications which render the C-terminus incapable of binding a GPI anchor,

wherein the modification may be selected from a modified serine residue; a modified glycine residue, a modified arginine residue or at least one modified amino acid of prion residues 228 to 256 that renders the Ser230 or Ser231 blocked from binding the GPI anchor. Such C-terminal modifications result in a lack of ability to attach to the GPI anchor and/or in conformational changes of the prion polypeptide such that the prion protein is rendered soluble under *in vivo* conditions.

Another group of prion polypeptides which are intended to be encompassed by the present invention, as "substantially corresponding" to amino acid sequences of known prion isoform proteins, are those in which at least one amino acid residue in a soluble prion protein molecule has been removed and a different residue inserted in its place, the number of substitutions being relatively small and well characterized or conservative, as described herein. For a detailed description of protein chemistry and structure, see Schulz, G.E. *et al.*, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, New York, 1978, and Creighton, T.E., Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, which are hereby incorporated by reference. The types of substitutions which may be made in the protein or peptide molecule of the present invention may be based on analysis of the frequencies of amino acid changes between a homologous protein of different species, such as those presented in Table 1-2 of Schulz *et al.* (*supra*) and Figure 3-9 of Creighton (*supra*). Based on such an analysis, conservative substitutions are defined herein as exchanges within one of the following five groups:

1. Small aliphatic, nonpolar or slightly polar residues: ala, ser, thr (pro, gly);
2. Polar, negatively charged residues and their amides: asp, asn, glu, gln;
3. Polar, positively charged residues: his, arg, lys;
4. Large aliphatic, nonpolar residues: met, leu, ile, val (cys); and
5. Large aromatic residues: phe, tyr, trp.

The three amino acid residues in parentheses above have

special roles in protein architecture. Gly is the only residue lacking any side chain and thus imparts flexibility to the chain. Pro, because of its unusual geometry, tightly constrains the chain. Cys can participate in disulfide bond formation which is  
5 important in protein folding. Note that Schulz et al. would merge Groups 1 and 2, above. Note also that tyr, because of its hydrogen bonding potential, has some kinship with ser, thr, etc.

Analogues of soluble prion polypeptides of the present invention include those with substantial changes in functional  
10 or immunological properties may be made to prion polypeptides of the present invention by selecting substitutions that are less conservative, such as between, rather than within, the above five groups, which will differ more significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the peptide backbone in the area  
15 of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain. Examples of such substitutions are (a) substitution of gly and/or pro by another amino acid or deletion or insertion of gly or pro;  
20 (b) substitution of a hydrophilic residue, e.g., ser or thr, for (or by) a hydrophobic residue, e.g., leu, ile, phe, val or ala; (c) substitution of a cys residue for (or by) any other residue; (d) substitution of a residue having an electropositive side chain, e.g., lys, arg or his, for (or by) a residue having an  
25 electronegative charge, e.g., glu or asp; or (e) substitution of a residue having a bulky side chain, e.g., phe, for (or by) a residue not having such a side chain, e.g., gly.

Most deletions, insertions, and substitutions according to the present invention are those which do not produce radical  
30 changes in the characteristics of the protein or peptide molecule. However, when it is difficult to predict the exact effect of the substitution, deletion, or insertion in advance of doing so, one skilled in the art will appreciate that the effect will be evaluated by routine screening assays, either  
35 immunoassays or bioassays.

The prion pathogenic activity of a modified prion polypeptide of the present invention can be screened in a suitable screening assay for the desired characteristic. For

example, a change in the immunological character of the protein molecule, such as binding to a given antibody, is measured by a competitive type immunoassay (see below). Biological activity is screened in an appropriate bioassay, such as prion infectivity, as described herein.

Modifications of such peptide properties as redox or thermal stability, hydrophobicity, susceptibility to proteolytic degradation or the tendency to aggregate with carriers or into multimers, are assayed by methods well known to the ordinarily skilled artisan.

Derivatization with bifunctional agents is useful for cross-linking the peptide to a water-insoluble support matrix or to other macromolecular carriers. Commonly used cross-linking agents include, e.g., 1,1-bis(diazoacetyl)-2-phenylethane, glutaraldehyde, N-hydroxysuccinimide esters, for example, esters with 4-azidosalicylic acid, homobifunctional imidoesters, including disuccinimidyl esters such as 3,3'-dithiobis(succinimidylpropionate), and bifunctional maleimides such as bis-N-maleimido-1,8-octane. Derivatizing agents such as methyl-3-[(p-azidophenyl)dithiol]propioimide yield photoactivatable intermediates that are capable of forming crosslinks in the presence of light. Alternatively, reactive water-insoluble matrices such as cyanogen bromide-activated carbohydrates and the reactive substrates described in U.S. Patent Nos. 3,969,287; 3,691,016; 4,195,128; 4,247,642; 4,229,537; and 4,330,440 are employed for protein immobilization.

Other modifications include hydroxylation of proline and lysine, phosphorylation of hydroxyl groups of seryl or threonyl residues, methylation of the alpha-amino groups of lysine, arginine, and histidine side chains (T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecule Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), acetylation of the N-terminal amine, and, in some instances, amidation of the C-terminal carboxyl groups.

One non-limiting example of a soluble prion polypeptide according to the present invention is one which has an amino acid sequence that substantially corresponds to the amino acid sequence of a human PrP<sup>C</sup> protein, but has a molecular weight of



33-37 kilodaltons on SDS polyacrylamide gel electrophoresis.

The isolated *in vivo* soluble PrP<sup>C</sup> prion protein of the present invention may have a C-terminal truncation which provides solubility of a prion protein *in vivo*, under physiological conditions, such as physiological pH, ionic strength, tonicity, and the like. In a further preferred embodiment of the present invention, the C-terminal truncation begins after a prion amino acid corresponding to Gly228 of hamster PrP<sup>Sc</sup>. The C-terminal truncation may begin between the a prion amino acid corresponding to Gly228 of hamster PrP<sup>Sc</sup> and an amino acid corresponding to Ser231 or Ser232 of human PrP<sup>C</sup>. The truncation may also be between a prion amino acid corresponding to amino acid Gly228 of hamster PrP<sup>Sc</sup> and a PIPLC digestion site phosphatidyl inositol phospholipase C, which cleaves at inositol glycan of GPI as the lipid to prevent.

The prion polypeptide of the present invention may also have a prion amino acid, essential for binding to the GPI anchor site, which is modified or deleted such that the prion polypeptide according to the present invention is rendered soluble, and wherein the *in vivo* soluble prion polypeptide has an truncated or non-truncated C-terminus substantially corresponding to a known insoluble prion protein, such that the folding confirmation of the peptide (as a function of one or more modified, deleted or substituted amino acid, or facilitate folding in the presence of a chaperonin or folding protein) renders the prion polypeptide soluble under *in vivo* conditions.

The presence of a soluble prion protein in a sample derived from a tissue of an animal may be detected by contacting the sample, which has undergone at least one of precipitation, centrifugation, dialysis, column chromatography and/or affinity chromatography, with a detectably labeled antibody which binds a C-terminal epitope specific to a soluble prion polypeptide; and detecting the soluble polypeptide which is bound to the labeled antibody. The antibodies can be selected from polyclonal or monoclonal antibodies generated against prion proteins or fragments thereof or the inositol glycan moiety of GPI.

Detection of soluble forms according to the present invention can also be used to determine PrP infection or the

presence of abnormal forms, such as PrP or PrP<sup>Sc</sup>, using proteinase K digestion of the cell or tissue sample containing soluble prion protein, prior to immunodetection, in order to remove the normal soluble form as PrP<sup>C</sup>, since the pathogenic or infectious form of PrP, as PrP or and/or PrP<sup>Sc</sup> is not substantially degraded by proteinase K.

To determine whether any given tissue or physiological or waste fluid source is a candidate for detection of soluble prion polypeptides, a sample of such a fluid or tissue is taken from an animal in which a soluble prion protein has already been detected in the cerebrospinal fluid. The same assay may then be performed, or any other suitable assay, on the tissue or fluid in question. If the soluble prion protein is found therein, then the source of such prion protein may be considered to be a source for the detection of a soluble prion protein in any animal. If the results are negative, the source of such a fluid or tissue is not expected to be useful for detection of a soluble prion protein. As indicated above, it is expected that a soluble prion protein will be widely prevalent in the tissues and fluids of animals. Alternatively, methods are well known for the synthesis of polypeptides of desired sequence on solid phase supports and their subsequent separation from the support. Once the exact sequence of the portion of the prion protein which causes *in vivo* solubility is determined (by routine techniques), it can also be synthesized. As a non-limiting example, such peptides, or the isolated soluble prion protein itself, can be used for generation of anti-prion polypeptide antibodies which are specific for soluble forms of prion proteins, and which distinguish over the insoluble forms.

The solution sample used for detection can be an animal or human subject tissue sample selected from cerebrospinal fluid, and are expected to also include blood, plasma, lymph, urine, saliva, brain, nervous tissue, eyes, or an internal organ. Animals include cows, sheep, goats, pigs, horses, elk, deer, rodents, mule and mink, and other mammals and birds.

A detection method according to the present invention can be any immunoassay selected from a an antibody capture assay, an antigen capture assay or a two-antibody sandwich assay. Such

immunoassays are well known in the art and an anti-prion antibody of the present invention can be used according to known immunoassay steps. Non-limiting examples of immunoassays suitable for use in detecting methods of the present invention include direct and sandwich ELISAs, radioimmune assays, enzyme immunoassays and the like, which method steps are well known in the art, as further described herein.

The soluble form of infectious or abnormal forms of prion protein are differentiated from normal forms, such as PrP<sup>C</sup>, by digestion with proteinase K of the sample prior to immunoblot analysis. Good results are expected for determining the presence of soluble forms of infectious or abnormal prion proteins using proteinase K digestion prior to immunoscreening using antibodies specific for an epitope located in the prion polypeptide.

This invention is also directed to an antibody specific for an epitope of a prion protein. Preferably antibodies of the present invention are specific for an epitope of at least 4 amino acids corresponding to at least 4 amino acids of residues 23-228, 23-227, 1-227, 1-228, 1-231, 23-231, 127-231, 200-228 and 200-227. The epitope may include, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 20, 25, 30, 40, 45, or more amino acids, as linear residues in the amino acid chain, or as amino acids forming an epitope due to the three-dimensional configuration of the prion protein *in vivo* or *in situ*. In a preferred embodiment, the epitope is a C-terminal epitope N-terminal to an amino acid corresponding to Gly228 of hamster PrP<sup>Sc</sup>. In another preferred embodiment of the present invention, the C-terminal epitope is between a prion amino acid corresponding to Gly228 of hamster PrP<sup>Sc</sup> and an amino acid corresponding to Ser231 or Ser232 of human PrP<sup>C</sup>. In still another preferred embodiment, the C-terminal epitope is between a prion amino acid corresponding to amino acid Gly228 of hamster PrP<sup>Sc</sup> and a PIPLC digestion site. In another preferred embodiment, the C-terminal epitope contains a prion amino acid, essential for binding to the GPI anchor site, which is modified or deleted such that the prion polypeptide according to the present invention is rendered soluble, and wherein the *in vivo* soluble prion polypeptide has a truncated or non-truncated N-terminus substantially corresponding to a known insoluble prion

protein, such that the folding confirmation of the peptide (with one or more modified, deleted or substituted amino acids) resulting solubility of the prion protein. Alternatively or additionally, folding in the presence of a chaperonin or folding protein is expected to renders the prion polypeptide soluble under *in vivo* conditions.

In additional embodiments, the antibody of the present invention is used to detect the presence of, or measure the quantity or concentration of, soluble prion proteins in a cell, or in a cell or tissue extract, or a biological fluid.

The term "antibody" is meant to include polyclonal antibodies, monoclonal antibodies (mAbs), chimeric antibodies, and anti-idiotypic (anti-Id) antibodies that are specific for soluble forms of a mammalian prion protein.

An antibody is said to be "capable of binding" a molecule if it is capable of specifically reacting with the molecule to thereby bind the molecule to the antibody. The term "epitope" is meant to refer to that portion of any molecule capable of being bound by an antibody which can also be recognized by that antibody. Epitopes or "antigenic determinants" usually consist of chemically active surface groupings of molecules such as amino acids or sugar side chains and have specific three dimensional structural characteristics as well as specific charge characteristics.

An "antigen" is a molecule or a portion of a molecule capable of being bound by an antibody which is additionally capable of inducing an animal to produce antibody capable of binding to an epitope of that antigen. An antigen may have one or more than one epitope. The specific reaction referred to above is meant to indicate that the antigen will react, in a highly selective manner, with its corresponding antibody and not with the multitude of other antibodies which may be evoked by other antigens.

Polyclonal antibodies are heterogeneous populations of antibody molecules derived from the sera of animals immunized with an antigen.

Monoclonal antibodies are a substantially homogeneous population of antibodies to specific antigens. MABs may be ob-

tained by methods known to those skilled in the art. See, for example Kohler and Milstein, Nature 256:495-497 (1975); U.S. Patent No. 4,376,110; Ausubel et al, eds. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Wiley Interscience, New York (1987, 1992); and Harlow and Lane, ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), the entire contents of which references are herein incorporated by reference. Such antibodies may be of any immunoglobulin class including IgG, IgM, IgE, IgA, and any subclass thereof. The hybridoma producing the mAbs of this invention may be cultivated in vitro or in vivo. Production of high titers of mAbs in vivo production makes this the presently preferred method of production. Briefly, cells from the individual hybridomas are injected intraperitoneally into pristane-primed Balb/c mice to produce ascites fluid containing high concentrations of the desired mAbs. MAb of isotype IgM or IgG may be purified from such ascites fluids, or from culture supernatants, using column chromatography methods well known to those of skill in the art.

Chimeric antibodies are molecules different portions of which are derived from different animal species, such as those having a variable region derived from a murine mAb and a human immunoglobulin constant region. Chimeric antibodies and methods for their production are known in the art (see, for example, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984); Neuberger et al., Nature 314:268-270 (1985); Sun et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218 (1987); Better et al., Science 240:1041- 1043 (1988); Better, M.D. International Patent Publication WO 9107494, which references are hereby incorporated by reference).

An anti-idiotypic (anti-Id) antibody is an antibody which recognizes unique determinants generally associated with the antigen-binding site of an antibody. An Id antibody can be prepared by immunizing an animal of the same species and genetic type (e.g. mouse strain) as the source of the mAb with the mAb to which an anti-Id is being prepared. The immunized animal will recognize and respond to the idiotypic determinants of the immunizing antibody by producing an antibody to these idiotypic determinants (the anti-Id antibody).

The anti-Id antibody may also be used as an "immunogen" to induce an immune response in yet another animal, producing a so-called anti-anti-Id antibody. The anti-anti-Id may bear structural similarity to the original mAb which induced the anti-Id. Thus, by using antibodies to the idiotypic determinants of a mAb, it is possible to identify other clones expressing antibodies of identical specificity.

Accordingly, mAbs generated against the prion protein of the present invention may be used to induce anti-Id antibodies in suitable animals, such as Balb/c mice. Spleen cells from such immunized mice are used to produce anti-Id hybridomas secreting anti-Id mAbs. Further, the anti-Id mAbs can be coupled to a carrier such as keyhole limpet hemocyanin (KLH) and used to immunize additional Balb/c mice. Sera from these mice will contain anti-anti-Id antibodies that have the binding properties of the original mAb specific for a prion protein epitope.

The anti-Id mAbs thus have their own idiotypic epitopes, or "idiotopes" structurally similar to the epitope being evaluated, such as an epitope of a prion protein.

The term "antibody" is also meant to include both intact molecules as well as fragments thereof, such as, for example, Fab and F(ab')<sub>2</sub>, which are capable of binding antigen. Fab and F(ab')<sub>2</sub> fragments lack the Fc fragment of intact antibody, clear more rapidly from the circulation, and may have less non-specific tissue binding than an intact antibody (Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983)).

It will be appreciated that Fab and F(ab')<sub>2</sub> and other fragments of the antibodies useful in the present invention may be used for the detection and quantitation of a prion protein according to the methods disclosed herein for intact antibody molecules. Such fragments are typically produced by proteolytic cleavage, using enzymes such as papain (to produce Fab fragments) or pepsin (to produce F(ab')<sub>2</sub> fragments).

The antibodies, or fragments of antibodies, of the present invention may be used to quantitatively or qualitatively detect the presence of cells which express a prion protein (or a chimeric receptor having a prion-derived epitope) in soluble form. This can be accomplished by immunofluorescence techniques

employing a fluorescently labeled antibody (see below) coupled with light microscopic, flow cytometric, or fluorometric detection.

The antibodies of the present invention may be employed histologically, as in immunofluorescence or immunoelectron microscopy, for in situ detection of a prion protein. In situ detection may be accomplished by removing a histological (cell or tissue) specimen from a subject and providing the a labeled antibody of the present invention to such a specimen. The antibody (or fragment) is preferably provided by applying or by overlaying on the biological sample. Through the use of such a procedure, it is possible to determine not only the presence of a prion protein but also its distribution on the examined tissue. Using the present invention, those of ordinary skill will readily perceive that any of a wide variety of histological methods (such as staining procedures) can be modified in order to achieve such in situ detection.

Additionally, the antibody of the present invention can be used to detect the presence of soluble prion molecules in a biological sample.

Such immunoassays for prion protein typically comprise incubating a biological sample, such as a biological fluid, a tissue extract, or freshly harvested cells, from such sources as CSF, or other body tissues, fluids, or waste fluids, or extracts or derivatives thereof, or cells which have been incubated in tissue culture, in the presence of a detectably labeled antibody capable of identifying soluble prion protein, and detecting the antibody by any of a number of techniques well-known in the art.

A soluble prion protein may be detected using polyclonal or monoclonal antibodies specific for insoluble or soluble prion proteins, since the insoluble prion proteins are not expected to be present in body fluids such as CSF or blood. However, monoclonal antibodies which distinguish between soluble and insoluble prion protein are also part of the present invention, since the discovery and isolation of soluble prion proteins allows for the generation of monoclonal antibodies according to known method steps, from which soluble specific monoclonals can be routinely screened using known method steps

to isolate soluble prion specific monoclonal antibodies that do not bind to insoluble forms of prion proteins.

The biological sample may be treated with a solid phase support or carrier (which terms are used interchangeably herein) such as nitrocellulose, or other solid support which is capable of immobilizing cells, cell particles or soluble proteins. The support may then be washed with suitable buffers followed by treatment with the detectably labeled prion-specific antibody. The solid phase support may then be washed with the buffer a second time to remove unbound antibody. The amount of bound label on the solid support may then be detected by conventional means.

By "solid phase support" or "carrier" is intended any support capable of binding antigen or antibodies. Well-known supports, or carriers, include glass, polystyrene, polypropylene, polyethylene, dextran, nylon, amylases, natural and modified celluloses, polyacrylamides, gabbros, and magnetite. The nature of the carrier can be either soluble to some extent or insoluble for the purposes of the present invention. The support material may have virtually any possible structural configuration so long as the coupled molecule is capable of binding to an antigen or antibody. Thus, the support configuration may be spherical, as in a bead, or cylindrical, as in the inside surface of a test tube, or the external surface of a rod. Alternatively, the surface may be flat such as a sheet, test strip, etc. Those skilled in the art will know many other suitable carriers for binding antibody or antigen, or will be able to ascertain the same by use of routine experimentation.

The binding activity of a given lot of anti-prion antibody may be determined according to well-known methods. Those skilled in the art will be able to determine operative and optimal assay conditions for each determination by employing routine experimentation.

One of the ways in which the antibody can be detectably labeled is by providing peptide probes or anti-target protein antibodies and linking the peptide probes or antibodies to an enzyme and use in an enzyme immunoassay (EIA). This enzyme, in turn, when later exposed to an appropriate substrate, will react



with the substrate in such a manner as to produce a chemical moiety which can be detected, for example, by spectrophotometric, fluorometric or by visual means. Enzymes which can be used to detectably label the antibody include, but are not limited to, malate dehydrogenase, staphylococcal nuclease, delta-5-steroid isomerase, yeast alcohol dehydrogenase, alpha-glycerophosphate dehydrogenase, triose phosphate isomerase, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, asparaginase, glucose oxidase, beta-galactosidase, ribonuclease, urease, catalase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glucoamylase and acetylcholinesterase. The detection can be accomplished by colorimetric methods which employ a chromogenic substrate for the enzyme. Detection may also be accomplished by visual comparison of the extent of enzymatic reaction of a substrate in comparison with similarly prepared standards.

Detection may be accomplished using any of a variety of other immunoassays or detectably labeled anti-prion antibodies or antibodies that bind anti-prion antibodies. For example, by radioactively labeling the anti-prion antibodies, antibody fragments, or antibodies specific therefore, it is possible to detect the labeled target protein through the use of a radioimmunoassay (RIA). A good description of RIA may be found in Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, by Work, T.S., et al., North Holland Publishing Company, New York (1978) with particular reference to the chapter entitled "An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques" by T. Chard, incorporated by reference herein. The radioactive isotope can be detected by such means as the use of a gamma counter or a liquid scintillation counter or by autoradiography.

It is also possible to label anti-prion antibodies, antibody fragments, or antibodies specific therefore, with a fluorescent compound. When the fluorescently labeled anti-prion antibodies, antibody fragments, or antibodies specific therefore, is exposed to light of the proper wave length, its presence can then be detected due to fluorescence. Among the most commonly used fluorescent labelling compounds are fluorescein isothiocyanate, rhodamine, phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin, o-phthalaldehyde and fluorescamine.

Anti-prion antibodies, antibody fragments, or anti-idiotypic antibodies specific therefore, can also be detectably labeled using fluorescence emitting metals such as  $^{152}\text{Eu}$ , or others of the lanthanide series. These metals can be attached to the anti-prion antibodies, antibody fragments, or anti-idiotypic antibodies specific therefore, using such metal chelating groups as diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) or ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

The anti-prion antibodies, antibody fragments, or anti-idiotypic antibodies specific therefore, also can be detectably labeled by coupling to a chemiluminescent compound. The presence of the chemiluminescent-tagged anti-prion antibodies, antibody fragments, or anti-idiotypic antibodies specific therefore, is then determined by detecting the presence of luminescence that arises during the course of a chemical reaction. Examples of particularly useful chemiluminescent labeling compounds are luminol, isoluminol, theromatic acridinium ester, imidazole, acridinium salt and oxalate ester.

Likewise, a bioluminescent compound may be used to label the anti-prion antibodies, antibody fragments, or anti-idiotypic antibodies specific therefore, of the present invention. Bioluminescence is a type of chemiluminescence found in biological systems in which a catalytic anti-prion antibodies, antibody fragments, or anti-idiotypic antibodies specific therefore, increases the efficiency of the chemiluminescent reaction. The presence of a bioluminescent anti-prion antibodies, antibody fragments, or anti-idiotypic antibodies specific therefore, is determined by detecting the presence of luminescence. Important bioluminescent compounds for purposes of labeling are luciferin, luciferase and aequorin.

The antibody molecules of the present invention may be adapted for utilization in an immunometric assay, also known as a "two-site" or "sandwich" assay. In a typical immunometric assay, a quantity of unlabeled antibody (or fragment of antibody) is bound to a solid support and a quantity of detectably labeled soluble antibody is added to permit detection and/or quantitation of the ternary complex formed between solid-phase antibody, antigen, and labeled antibody.

Typical, and preferred, immunometric assays include "forward" assays in which the antibody bound to the solid phase is first contacted with the sample being tested to "extract" the antigen from the sample by formation of a binary solid phase antibody-antigen complex. After a suitable incubation period, the solid support is washed to remove the residue of the fluid sample (as a solubilized or aqueous tissue), including antigen (as unreacted prion polypeptide or a fragment thereof), if any, and then contacted with the solution containing an unknown quantity of labeled antibody (which functions as a "reporter molecule"). After a second incubation period to permit the labeled antibody to complex with the antigen bound to the solid support through the unlabeled antibody, the solid support is washed a second time to remove the unreacted labeled antibody.

In another type of "sandwich" assay, which may also be useful with the antigens of the present invention as soluble prion polypeptides, the so-called "simultaneous" and "reverse" assays are used. A simultaneous assay involves a single incubation step as the antibody bound to the solid support and labeled antibody are both added to the sample being tested at the same time. After the incubation is completed, the solid support is washed to remove the residue of fluid sample and uncomplexed labeled antibody. The presence of labeled antibody associated with the solid support is then determined as it would be in a conventional "forward" sandwich assay.

In the "reverse" assay, stepwise addition first of a solution of labeled anti-prion antibody to the fluid sample followed by the addition of unlabeled antibody bound to a solid support after a suitable incubation period is utilized. After a second incubation, the solid phase is washed in conventional fashion to free it of the residue of the sample being tested and the solution of unreacted labeled antibody. The determination of labeled antibody associated with a solid support is then determined as in the "simultaneous" and "forward" assays.

According to the present invention, it is possible to detect soluble prion polypeptides in a tissue of an animal or human subject. This is accomplished by means of an immunoassay, as described above, using an anti-prion antibody of the present

invention or a functional derivative thereof.

According to another aspect of the present invention, known method steps can be used to purify soluble forms of prion proteins, based on the finding that such soluble forms exist *in vivo* and *in situ*, which purification would be obtainable by one ordinary skill in the art using known method steps based on the teaching and guidance presented herein. One non-limiting example of a soluble prion purification method according to the present invention from a solution sample comprises precipitating the sample with ammonium sulfate to provide incremental percentage fractions; centrifuging and dialyzing the fractions and determining which fractions contain soluble prion polypeptides using anti-prion antibodies which bind a prion protein specific epitope, as specific percent fraction which contain the soluble polypeptide; and recovering the soluble polypeptide from the percent fraction containing the *in vivo* soluble prion polypeptide.

Purification of soluble forms or prion proteins according to the present invention can also be used to selectively provide soluble infectious or abnormal prion forms, such as PrP or PrP<sup>Sc</sup>, using proteinase K digestion of the cell or tissue sample containing soluble prion protein, prior to precipitation, in order to remove the normal soluble form as PrP<sup>C</sup>, since the pathogenic or infectious form of PrP, as PrP or and/or PrP<sup>Sc</sup> is not substantially degraded by proteinase K.

Preferably, the percent ammonium sulfate fraction is a 30-60% fraction, such as a 40, 45, 50, 55 or 60%. In another preferred embodiment, the antibodies are selected from polyclonal or monoclonal, and are alternatively generated against at least a portion of a PrP, PrP<sup>C</sup>, or a PrP<sup>Sc</sup> prion polypeptide, as described herein, as a animal or human PrP. Non-limiting examples of animal prions may include those of bovine, ovine, goat, sheep, horse, mouse, hamster, deer, elk, mule and mink, such as those involved in scrapie, spongiform encephalopathy, transmissible mink encephalopathy and chronic wasting disease of mule deer and elk. Human prion related diseases include, but are not limited to Kuru, Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD), Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome (GSS), as well as prion associated

human neurodegenerative diseases.

A soluble prion polypeptide detecting method of the present invention may be used on a sample taken from an animal or human subject tissue selected from cerebral spinal fluid, blood, plasma, lymph, urine, saliva, brain, nervous tissue, eyes, or internal organ.

The following examples are presented by way of explanation and not by way of limitation. The present invention lies in the discovery of soluble prion proteins, and polypeptide, antibodies and purification and detection methods involving these soluble prions based on this discovery are all part of the present invention.

**EXAMPLE 1: DETECTION AND SEQUENCING OF A  
SOLUBLE HUMAN PRION POLYPEPTIDE IN HUMAN CSF**

**MATERIALS AND METHODS:** Antisera: Two antisera, designated anti-PrP N were raised in rabbits to the synthetic peptide K-K-R-P-K-P-G-G-W-N-T-G-G-S-R-Y-P-G-G-C (SEQ ID NO:2), that corresponds to residues 23-40 of the amino acid sequence deduced from the human PrP cDNA, except for the addition of Gly-Cys at the C-terminus for spacing and coupling. This peptide was synthesized by solid phase techniques using Fmoc-t-butyl-polyamide chemistry, purified by HPLC using a  $\mu$ -Bondapak C18 column (Waters), and coupled to keyhole limpet hemocyanin with m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide. Immunization was carried out according to known method steps, e.g., as described previously (Ghisso et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 163:430-437 (1989)) and antibody titer was evaluated by ELISA. Anti-PrP 27-30 was generated by immunizing rabbits with the protease-resistant core of PrP<sup>Sc</sup> (i.e., 27-30) purified from scrapie-infected hamster brains (see, Turk et al Eur. J. Biochem. 176:21-30 (1988); Bary and Prusiner J. Infect. Dis. 154:518-521 (1986)).

**Fractionation of CSF proteins:** Samples of CSF were collected from three individuals aged 3, 17 and 29 years, who received external shunting for tension hydrocephalus due to germinoma of the pineal region, stenosis of the aqueduct and gangliocytoma of the cerebellum, respectively. The protein content of the samples was lower than 100 mg per 100 ml, and

blood cells were absent. By ammonium sulphate precipitation four fractions were obtained, that corresponded to the precipitates at salt concentration of 25%, 50% and 70% (designated as P1, P2 and P3, respectively) and to the 70% supernatant (designated as S3). P1, P2 and P3 were redissolved in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, and dialyzed against distilled water using tubular membranes with a molecular weight cut off of 12,000-14,000. After centrifugation at 50,000 x g for 30 minutes, pellets (designated as P1p, P2p, and P3p, respectively) and supernatants (designated as P1s, P2s and P3s, respectively) were lyophilized. S3 was dialyzed against distilled water and lyophilized.

Immunoblot analysis: Aliquots of the fractions were redissolved in 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5, and proteins were determined using the Coomassie blue dye-binding assay (Bio-Rad). Samples containing 50 µg protein were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (10% or 15% monomer) under reducing conditions and electrotransferred to ProBlott membrane (Applied Biosystems) using 10 mM 3-cyclohexylamino-1-propanesulfonic acid buffer, pH 11, 10% methanol. The membranes were either stained with Coomassie blue or immunostained with anti-PrPN antiserum (1: 500), as described previously (Tagliavini et al EMBO. J. 10:513-519 (1991)). Proteins specifically detected by the antiserum were identified by using anti-PrPN preabsorbed with 10 mM of the relevant peptide for 60 minutes at 37°C. Aliquots of the CSF fraction containing anti-PrPN immunoreactive proteins were treated with proteinase K (20 µg/ml) for 60 minutes at 37°C. Digestion was terminated by the addition of 20 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, and the samples were subjected to immunoblot analysis with anti-PrP 27-30 antiserum (1:1,000).

Protein Sequence Analysis: Coomassie blue-stained bands corresponding to bands specifically labeled by anti-PrPN antiserum were excised and analyzed with 477A microsequencer (Applied Biosystems) for N-terminal amino sequence. The resulting phenylthiohydantoin amino acid derivatives were identified using the on-line 120A PTH analyzer and the standard program (Applied Biosystems).

Results and Discussion: Immunoblot analysis of CSF

showed that fraction P2, corresponding to the precipitate at 50% ammonium sulfate concentration, contained at 33-37 kDa protein band that was specifically labeled by anti-PrPN antiserum (Figure 1). This band was consistently observed in CSF samples of all subjects and was completely degraded by proteinase K digestion, thus resembling PrP<sup>C</sup>. N-terminal sequence analysis of the anti-PrP immunoreactive band by automated Edman degradation yielded K-X-P-K-(P)-G-G-(P)-N-T (SEQ ID NO:1), which aligns at position 24 of the amino acid sequence deduced from human PrP cDNA, one residue beyond the predicted signal peptide cleavage site (Puckett, C. et al. Am. J. Hum. Genet. 49:320-329 (1991); Hope, J. et al. EMBO J. 5:2591-2597 (1986)). In this regard, N-terminal heterogeneity of PrP<sup>Sc</sup> purified from scrapie-infected hamster brains with a major sequence starting at position 23 and two minor sequences beginning at residues 24 and 31, respectively, has been reported (Turk et al Eur. J. Biochem. 176:21-30 (1988)). In the second cycle of the Edman degradation, the Arg signal was not detected at this position as has been observed previously in sequencing studies of hamster PrP<sup>C</sup> and PrP<sup>Sc</sup>, suggesting that this residue might undergo post-translational modifications which preclude its detection during gas-phase sequencing (Turk, id.). N-terminal sequences of apolipoproteins E and J, and of the  $\alpha$ -chain of complement C4 were also identified in CSF fraction P2p, comigrating with PrP<sup>C</sup>. These proteins comprised mainly the higher molecular weight sector of the 33-37 kDa protein band, whereas PrP<sup>C</sup> was found predominantly in the lower portion of the band.

In situ hybridization studies have shown that in the central nervous system PrP mRNA is expressed in a variety of cells, including choroid plexus epithelial cells, ependymal cells and meningeal cells (Brown, H.R. et al. Acta Neuropathol. 80:1-6 (1990)). Accordingly, PrP<sup>C</sup> secreted in human CSF is expected to originate from different cell populations. It is expected that PrP<sup>C</sup> and/or PrP<sup>Sc</sup>, and other PrP pathogenic prion proteins from animals and humans are derived from membrane-bound molecules by endogenous GPI-releasing activities, correspond to a C-terminal truncated PrP<sup>C</sup> derivative, and/or are due to folding proteins such as chaperonins. The soluble form of infectious or

abnormal forms of prion protein are differentiated from normal forms, such as PrP<sup>C</sup>, by digestion with proteinase K of the sample prior to immunoblot analysis. Good results are expected for determining the presence of soluble forms of infectious or abonormal prion proteins using proteinase K digestion prior to immunoscreening using antibodies specific for an epitope located in the prion polypeptide, preferably for an epitope of at least 3 amino acids corresponding to at least 3 amino acids of residues 23-227, 1-227, 1-228, 1-231, 23-231, 127-231, 200-228 and 200-227.

It is expected that since a soluble form of PrP<sup>C</sup> is found in CSF of normal individuals, a soluble form of PrP<sup>Sc</sup> is generated in prion-related encephalopathies. Accordingly, it is expected that PrP<sup>Sc</sup> secreted from cells plays a crucial role in the dissemination of the disease process.

All references cited herein, including journal articles or abstracts, published or corresponding U.S. or foreign patent applications, issued U.S. or foreign patents, or any other references, are entirely incorporated by reference herein, including all data, tables, figures, and text presented in the cited references. Additionally, the contents of the references cited within the references cited herein are also entirely incorporated by reference.

Reference to known method steps, conventional methods steps, known methods or conventional methods is not in any way an admission that any aspect, description or embodiment of the present invention is disclosed, taught or suggested in the relevant art.

The foregoing description of the specific embodiments will so fully reveal the general nature of the invention that others can, by applying knowledge within the skill of the art (including the contents of the references cited herein), readily modify and/or adapt for various applications such specific embodiments, without undue experimentation, without departing from the generic concept of the present invention. Therefore, such adaptations and modifications are intended to be comprehended within the meaning and range of equivalents of the disclosed embodiments, based on the teaching and guidance



presented herein. It is to be understood that the phraseology or terminology herein is for the purpose of description and not of limitation, such that the terminology or phraseology of the present specification is to be interpreted by the skilled artisan in light of the teachings and guidance presented herein.

## SEQUENCE LISTING

## (1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT: TAGLIAVINI, FABRIZIO  
FRANGIONI, BLAS

5 (ii) TITLE OF INVENTION: SOLUBLE PRION POLYPEPTIDES, AND METHODS  
FOR DETECTING AND PURIFYING THEREOF

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 2

## (iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

10 (A) ADDRESSEE: BROWDY AND NEIMARK  
(B) STREET: 419 SEVENTH STREET, N.W., SUITE 300  
(C) CITY: WASHINGTON  
(D) STATE: D.C.  
15 (E) COUNTRY: USA  
(F) ZIP: 20004

## (v) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk  
(B) COMPUTER: IBM PC compatible  
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
20 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

## (vi) CURRENT APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: US 07/883,875  
(B) FILING DATE: 15-MAY-1992  
(C) CLASSIFICATION:

## 25 (viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

(A) NAME: TOWNSEND, GUY K.  
(B) REGISTRATION NUMBER: 34,033  
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: TAGLIAVINI=1

## (ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

30 (A) TELEPHONE: 202-628-5197  
(B) TELEFAX: 202-737-3528  
(C) TELEX: 248633

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

35 (A) LENGTH: 10 amino acids  
(B) TYPE: amino acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

## (ii) MOLECULE TYPE: peptide

## 40 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

Lys Xaa Pro Lys Pro Gly Gly Pro Asn Thr  
1 5 10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 20 amino acids  
(B) TYPE: amino acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

## (ii) MOLECULE TYPE: peptide

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Trp Asn Thr Gly Gly Ser Arg Tyr  
1 5 10 15

Pro Gly Gly Cys  
20

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A soluble prion polypeptide comprising an amino acid sequence capable of being purified from cerebrospinal fluid.

2. A soluble prion protein, comprising an amino acid sequence substantially corresponding to a peptide sequence of an prion protein selected from post-transcriptionally modified PrP<sup>C</sup>, a PrP or a PrP<sup>Sc</sup> prion protein, wherein said soluble prion polypeptide has a modified C-terminus such that said polypeptide is soluble under *in vivo* conditions.

3. A soluble prion polypeptide according to claim 1, wherein said prion protein has a molecular weight of 33-37 kilodaltons on SDS polyacrylamide gel electrophoresis and wherein the prion protein comprises the N-terminal amino acid sequence (SEQ ID NO:1) K-X-P-K-P-G-G-P-N-T.

4. A soluble prion polypeptide according to claim 2, wherein said C-terminal modification is selected from a C-terminal truncation of amino acids 228-253 or C-terminal modification.

5. A soluble prion polypeptide according to claim 4, wherein said C-terminal modification is an amino acid modification which renders the C-terminus incapable of binding a GPI anchor, said modification selected from (a) a modified serine residue; (b) a modified arginine residue (c) a modified glycine residue or (d) at least one modified amino acid of prion residues 228 to 256 that renders the Ser230 or Ser231 blocked from binding the GPI anchor.

6. A method for detecting, in a sample, a soluble prion polypeptide according to claim 1, comprising

(A) contacting said sample with a detectably labeled antibody which binds a prion specific epitope; and

(B) detecting any soluble polypeptide which is bound to said labeled antibody.

7. A method according to claim 6, further comprising, prior to said contacting step (a), adding proteinase K to said sample such that PrP<sup>C</sup> in said sample is substantially digested and PrP or PrP<sup>Sc</sup> is substantially undigested.

8. A method according to claim 6, wherein said antibodies are selected from polyclonal or monoclonal.

9. A method according to claim 6, wherein said solution sample is an animal or human subject tissue sample selected from cerebrospinal fluid, blood, plasma, lymph, urine or saliva.

5 10. A method according to claim 6, wherein said contacting is performed as part of an immunoassay method selected from a an antibody capture assay, an antigen capture assay or a two-antibody sandwich assay, selected from an ELISA, an EIA, a dot blot or an RIA.

10 11. A method according to claim 6, wherein said detectable labeled antibody is labeled with a detectable label selected from a radiolabel, a fluorescent label and an enzymatic label.

12. A method for purifying a soluble prion polypeptide according to claim 1 from a solution sample, comprising

(A) precipitating said sample with ammonium sulfate to provide incremental percentage fractions;

(B) precipitating and dialyzing the incremental fractions;

20 (C) contacting the incremental fractions with anti-prion antibodies which bind a prion protein specific epitope to determine a percent fraction which contain said soluble polypeptide; and

(D) recovering said soluble polypeptide from said percent fraction containing said soluble prion polypeptide.

25 13. A method according to claim 12, further comprising, prior to said precipitating step (a), adding proteinase K to said sample such that PrP<sup>C</sup> in said sample is substantially digested and PrP or PrP<sup>Sc</sup> is substantially undigested.

30 14. A method according to claim 12, wherein said percent fraction is a 50% ammonium sulfate fraction.

15. A method according to claim 13, wherein said antibodies are selected from polyclonal or monoclonal.

35 16. A method according to claim 12, wherein said solution sample is an animal or human subject tissue sample selected from cerebrospinal fluid, blood, plasma, lymph, urine, saliva, brain, nervous tissue, eyes, or internal organ.

17. An antibody, anti-idiotypic antibody or a fragment thereof, comprising an epitope binding portion of an antibody which binds an epitope of a soluble prion polypeptide according to claim 1.

5 18. An antibody or fragment according to claim 16, wherein said antibody or fragment is monoclonal or polyclonal.

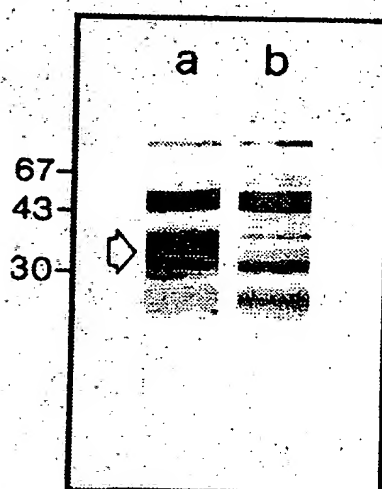
19. An antibody or fragment according to claim 16, wherein said antibody or fragment does not bind an epitope of an insoluble form of a prion protein.

10 20. An antibody or fragment according to claim 18, wherein said epitope consists essentially of at least 4 amino acids corresponding to amino acids N-terminal to amino acid 228 of a prion protein.

1/1

## FIG. 1

CSF fraction P2p



a: anti-PrPN

b: anti-PrPN after absorption

SUBSTITUTE SHEET

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US93/04600

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(5) : C07K 13/00, 15/12, 15/28; C12Q 1/02

US CL : 530/395, 388.2; 435/7.92

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 530/395, 388.2; 435/7.92, 69.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Keyword databases: Dialog, USPTO-APS

Search terms: prion, cerebrospinal

Sequence databases: GenBank, EMBL, GeneSeq, SwissProt, PIR

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	Biochemistry, Volume 26, issued 1987, B. Hay et al., "Evidence for a Secretary Form of the Cellular Prion Protein", pages 8110-8115, especially page 8110 and Figs. 1 and 7.	<u>1,2,4,5</u> 3, 6-20
Y	Biochemistry, Volume 29, Number 38, issued 25 September 1990, N. Stahl et al., "Identification of Glycoinositol Phospholipid Linked and Truncated Forms of the Scrapie Prion Protein", pages 8879-8884, especially the abstract and pages 8882-8883.	1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be part of particular relevance

\*E\* earlier document published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\*

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\*

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\*

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

\*Z\*

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 August 1993

Date of mailing of the international search report

AUG 20 1993

Name and mailing address of the ISA/US  
Commissioner of Patents and Trademarks  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. NOT APPLICABLE

Authorized officer

ROBERT J. HILL, JR.

Telephone No. (703) 308-0196



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US93/04600

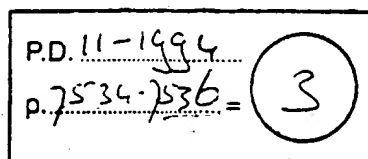
## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	European Journal of Biochemistry, Volume 176, issued 1988, E. Turk et al., "Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins", pages 21-30, especially the abstract and Fig. 8.	5-20
X,P	Biochemical and Biophysical Research Communications, Volume 184, Number 3, issued 15 May 1992, F. Tagliavini et al., "A soluble form of prion protein in human cerebrospinal fluid: Implications for prion-related encephalopathies", pages 1398-1404, see the entire document.	1-20
A	Science, Volume 252, issued 14 June 1991, S. B. Prusiner, "Molecular Biology of Prion Diseases", pages 1515-1522.	1-20
A	Cell, Volume 38, issued August 1984, S. B. Prusiner et al., "Purification and Structural Studies of a Major Scrapie Prion Protein", pages 127-134.	1-20
A,P	Biochemistry, Volume 32, issued 1993, D. A. Harris et al., "Processing of a Cellular Prion Protein: Identification of N- and C-Terminal Cleavage Sites", pages 1009-1016.	1-20



XP 002042242

NOTES



## Amphotericin B Delays both Scrapie Agent Replication and PrP-res Accumulation Early in Infection

DEBBIE MCKENZIE,\* JEAN KACZKOWSKI, RICHARD MARSH, AND JUDD AIKEN

Department of Animal Health and Biomedical Sciences, University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin 53706

Received 7 December 1993/Accepted 29 July 1994

Amphotericin B delays the onset of clinical symptoms in hamsters infected with scrapie agent strain 263K. Here we show that accumulation of a scrapie-specific isoform of the prion protein (PrP-res) and agent replication were delayed early in amphotericin B-treated animals. By 8 weeks postinfection, only untreated animals exhibited clinical symptoms of scrapie infection whereas PrP-res levels and titers were similar in treated and untreated animals. This suggests that although PrP-res accumulation and agent replication are linked, they are not the sole factors required for the onset of clinical disease.

Scrapie is a transmissible neurodegenerative disease that occurs naturally in sheep and goats. It is characterized by a long incubation period and spongiform degeneration of the brain and is always fatal. A scrapie-specific isoform of the prion protein (PrP-res) is a major component of many infectious preparations and is thought to be a major, if not the sole, component of the scrapie agent. Although the function of PrP-res has not been determined, PrP-res has been implicated as having a major role in agent replication (4, 16) and/or scrapie pathogenesis (7-10, 18).

The fungicide amphotericin B (AmB) has been shown to prolong the clinical course of the disease in hamsters experimentally infected with the 263K strain of the scrapie agent (14, 15). Subsequent studies suggested that AmB has no effect upon agent replication while delaying both clinical symptoms and accumulation of PrP-res (19). This separation of PrP-res accumulation from agent replication and clinical symptoms suggested that AmB-treated animals could be valuable tools for understanding both the mechanism of replication and the composition of the scrapie agent. Since our laboratory has been actively involved in determining the subcellular localization of the infectious agent, AmB treatment appeared to offer a unique opportunity to characterize the infectious agent in the absence of PrP-res. Our initial experiments involved determining whether AmB would give the same results as reported by Xi et al. (19). Although we observed a similar extension of the incubation period, we could not separate agent replication from PrP-res accumulation.

The effect of AmB on the incubation period was determined by inoculating outbred, weanling male Syrian hamsters intracerebrally with 50  $\mu$ l of a 1.0% brain homogenate from hamsters infected with the 263K strain of the scrapie agent. One group (controls) was either not treated or mock inoculated with 5% glucose. The second group was inoculated intraperitoneally daily (6 of 7 days) with 1.0 mg of AmB (Sigma) per kg of body weight, freshly diluted in 5% glucose,

starting on the first day postinoculation. Hamsters were monitored regularly, and the onset and progression of clinical symptoms were determined as described by Prusiner et al. (17). All scoring was performed blind, i.e., the individual scoring the animals was not aware of the treatment regimen. As in previous AmB studies (15), we observed a significant delay (28 days) in the onset of clinical symptoms in AmB-treated animals ( $n = 25$ ) compared with that in untreated animals ( $n = 19$ ; Table 1). The clinical courses of the disease were, however, similar in the two groups, with both groups progressing from onset of clinical symptoms to death in approximately 3 weeks.

To examine the effect of AmB upon agent replication and PrP-res accumulation, a time course study was initiated. Animals were treated as described above, except that a subset of both control and AmB-treated animals was sacrificed at 4, 6, 8, and 10 weeks postinfection. Three hamster brains from each time point were pooled and homogenized in 20% TEN buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 133 mM NaCl; pH 8.3).

An aliquot was removed for animal bioassay; while the remainder was diluted 1:1 in 20% N-lauroylsarcosine-TEN (pH 8.3)-1 mM dithiothreitol and used for purification of PrP-res. The time course experiments were repeated a minimum of four times, and both PrP-res accumulation and agent replication results from each time course experiment were analyzed.

Total brain homogenates were assayed for scrapie infectivity by the time interval assay (17). Dilutions ( $10^{-1}$  to  $10^{-7}$ ) of 10% brain homogenate were inoculated intracerebrally into weanling Syrian hamsters. The hamsters were monitored regularly for the onset of clinical symptoms. Infectivity levels in AmB-

TABLE 1. Effect of AmB on incubation period of hamsters infected with strain 263K scrapie agent

Group	Mean $\pm$ SE no. of days (no. of animals) to:	
	Disease onset <sup>a</sup>	Death <sup>b</sup>
AmB treated	37.5 $\pm$ 4.8 (25)	107.0 $\pm$ 3.1 (16)
Untreated (control)	61.7 $\pm$ 2.6 (19)	83.7 $\pm$ 2.8 (12)

<sup>a</sup>  $t = 22.2$  ( $P \leq 0.0005$ ).

<sup>b</sup>  $t = 20.0$  ( $P \leq 0.0005$ ).

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Animal Health and Biomedical Sciences, University of Wisconsin-Madison, 1655 Linden Dr., Madison, WI 53706. Phone: (608) 262-0427. Fax: (608) 262-7420. Electronic mail address: dm@zeus.uhubs.wisc.edu.



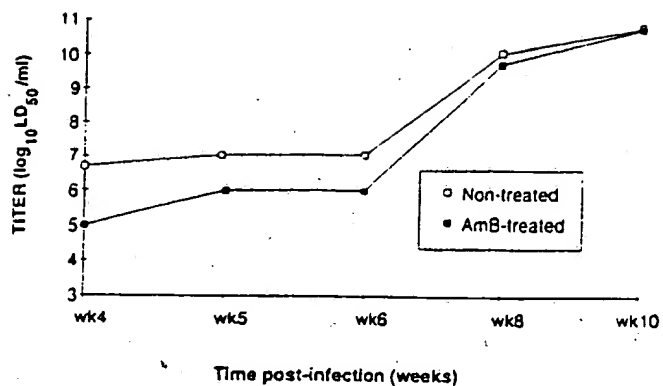


FIG. 1. Scrapie titers in brains of control and AmB-treated, scrapie-infected animals. Dilutions of 10% homogenates from AmB-treated and control scrapie-infected brains were inoculated intracerebrally into hamsters and scored for the onset of clinical symptoms. The titers were determined by the time interval assay. Titer differences were statistically significant at 4 ( $\alpha = 0.01$ ) and 5 ( $\alpha = 0.05$ ) weeks postinoculation by the nonparametric Mann-Whitney U test. Titer differences between treated and nontreated animals 6 to 10 weeks postinoculation were not statistically significantly different. LD<sub>50</sub>, 50% lethal dose.

treated animals were 2 orders of magnitude lower than those of nontreated animals at 4 weeks postinoculation (Fig. 1). Gradually, the difference in infectivity level between untreated and treated animals decreased, so that by 6 weeks postinoculation, there was no statistically significant difference in titer. Since brain titers were very similar in both AmB-treated and nontreated animals at 8 and 10 weeks postinfection and only nontreated animals presented clinical signs of disease at those times, it appears that brain infectivity is not the sole determinant of the onset of clinical disease.

We then compared the accumulation of PrP-res in AmB-

treated and nontreated animals to determine if AmB affects the formation and/or accumulation of PrP-res. For these analyses, brain homogenates were prepared in accordance with a modification of the protocol described by Bolton et al. (3). For proteinase K digestion, the protein samples were diluted to 1 mg/ml in 1% *N*-lauroylsarcosine-10% NaCl-1 mM dithiothreitol and treated with 100  $\mu$ g of proteinase K per ml for 1 h at 37°C. The relative amounts of PrP-res in AmB-treated and untreated animals at each time point were determined by Western blot (immunoblot) analysis. Fivefold dilutions of PrP-res (based on brain equivalents) were fractionated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis on a minislab gel apparatus (Hoefer Scientific, San Francisco, Calif.) by using 4% stacking and 12% resolving gels (13). Proteins were electrophoretically transferred to Immobilon P membrane (Millipore) with a Hoefer semidry transfer apparatus and stained with anti-PrP monoclonal antibody 3F4 (11) as described by Bessen and Marsh (1). Comparison of the staining intensities on the Western blots demonstrated that PrP-res accumulation in AmB-treated animals was lower (5 to 25-fold) 4 to 6 weeks postinoculation (Fig. 2). This difference in PrP-res accumulation decreased at later time points, with PrP-res levels being approximately equivalent (one- to fivefold lower) at 8 weeks postinfection and perhaps even higher in AmB-treated than in untreated animals by 10 weeks.

Our data suggest that the delay in the onset of clinical symptoms in AmB-treated hamsters may be linked to concurrent delays in accumulation of PrP-res and/or agent replication. Xi et al. (19), however, found 100 to 1,000-fold less PrP-res in AmB-treated animals early in infection than in untreated animals, with no difference between the agent replication rates. They concluded that PrP-res is not linked to agent replication. The reasons for the differences between our study and that of Xi et al. (19) are unclear. Although both laboratories used outbred Syrian hamsters and the 263K strain of the hamster scrapie agent, we cannot rule out differences between the hamster populations or variability in the agent. It

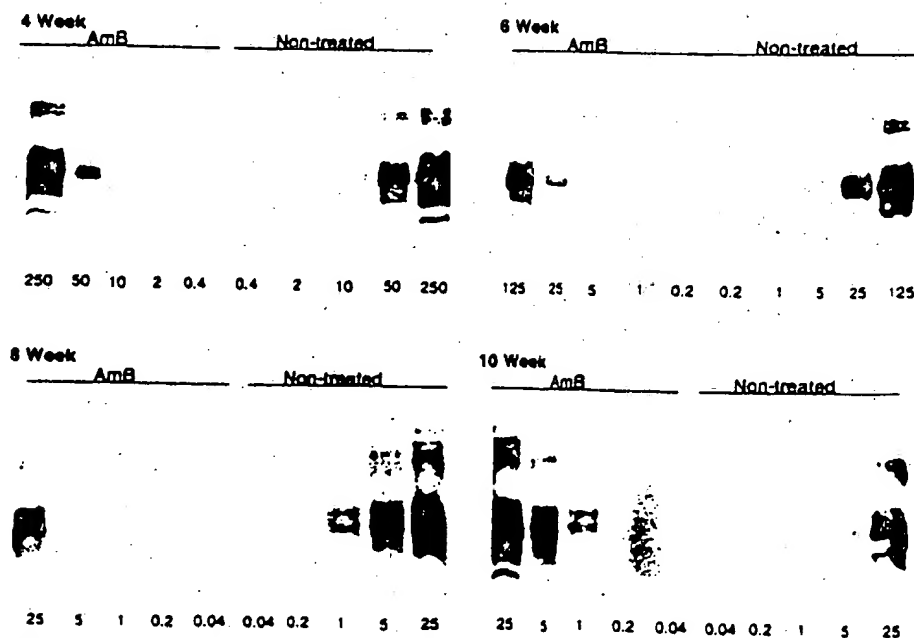


FIG. 2. Semiquantitation of PrP-res isolated from brains of scrapie-infected hamsters. Milligram brain equivalents (a series of 1:5 dilutions) of PrP-res-enriched fractions were fractionated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to Immobilon P, and stained with mouse anti-PrP monoclonal antibody 3F4. Representative Western blots of PrP-res from 4, 6, 8, and 10 weeks postinfection are shown.



is possible that different formulations of AmB elicit different responses; however, the extensions of the incubation period caused by AmB in our study and theirs are similar. Another difference in the experimental design is that Xi et al. (19) used PrP-res as the inoculum whereas we used brain homogenates in the bioassay studies.

It is not possible to determine how AmB affects the scrapie agent or if the interaction is direct. Although both infectivity and PrP-res levels are lower in AmB-treated animals at early time points, both are nearly equivalent to those of untreated animals at 8 and 10 weeks postinfection. This suggests that AmB affects uptake into specific cell types. Kimberlin and Walker (12) have previously proposed that there are specific areas of the brain (clinical target areas) in which scrapie-induced changes lead to clinical disease manifestation. The concept of clinical target areas also suggests that much of the replication of the scrapie agent, and perhaps conversion of PrP from the normal isoform (PrP-sen) to PrP-res, has no effect on the clinical changes monitored. If the conversion of PrP-sen to PrP-res is tightly linked to agent replication, then both may be involved in initiation of pathology. It is, however, possible that AmB has a more indirect role in inhibiting replication of the scrapie agent in that the drug may interfere with uptake into cells, thus delaying an entire cascade of events. Further evidence suggesting that AmB affects targeting of the agent is its strain specificity. We have tested AmB on the DY strain of the hamster-adapted transmissible mink encephalopathy agent (2) and found that AmB had no effect (i.e., both AmB-treated and nontreated DY-infected animals had incubation periods of approximately 160 days). Thus, AmB affects only the incubation period of the 263K strain of the agent and not that of the scrapie 139H or 139A strain (19) or the DY transmissible mink encephalopathy agent strain. Since different strains of the scrapie agent are associated with different pathology profiles and PrP-res accumulation occurs in different areas of the brain, depending on the strain of the agent (5, 6), it is possible that AmB has a selective effect on those cells which support replication of the 263K strain of the scrapie agent. Characterization of the mechanism by which AmB affects scrapie agent replication should contribute to our understanding of the relationship between PrP-res, agent replication, and onset of clinical disease.

In summary, we have confirmed that AmB treatment of hamsters infected with the 263K strain of the scrapie agent delays the onset of clinical disease. Contrary to the data of Xi et al. (19), our data support the hypothesis that PrP-res accumulation and agent replication are linked. Neither, however, appears to be the sole determinant of the onset of clinical disease.

We thank Jason Bartz for assistance with the AmB inoculations, Mike Strand for help with the statistical analysis of the data, Jena Johnson for assistance with the photography, Lavern Bahler for scoring the animals, and the members of the Aiken laboratory and Richard Bessen for helpful discussions of the manuscript.

This research was supported by National Institutes of Health grant 1R29 AI29487-01 and an Alzheimer's Disease Research grant, a program of the American Health Assistance Foundation.

## REFERENCES

1. Bessen, R. A., and R. F. Marsh. 1992. Biochemical and physical properties of the prion protein from two different strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J. Virol.* 66:2096-2101.
2. Bessen, R. A., and R. F. Marsh. 1992. Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters. *J. Gen. Virol.* 73:329-334.
3. Bolton, D. C., P. E. Bendheim, A. D. Marmorstein, and A. Potempska. 1987. Isolation and structural studies of the intact scrapie agent protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 258:579-590.
4. Bolton, D. C., M. P. McKinley, and S. B. Prusiner. 1982. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218:1309-1311.
5. Bruce, M. E., and H. Fraser. 1991. Scrapie strain variation and its implications. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 172:125-138.
6. Bruce, M. E., P. A. McBride, and C. F. Farquhar. 1989. Precise targeting of the pathology of the sialoglycoprotein, PrP, and vacuolar degeneration in mouse scrapie. *Neurosci. Lett.* 102:1-6.
7. Czub, M., H.-R. Braig, and H. Düringer. 1988. Replication of the scrapie agent in hamsters infected intracerebrally confirms the pathogenesis of an amyloid-inducing virosis. *J. Gen. Virol.* 69:1753-1756.
8. Doh-ura, K., J. Tateishi, J. Sasaki, T. Kitamoto, and Y. Sakaki. Pro-Leu change at position 102 of prion protein is the most common but not the sole mutation related to Gerstmann-Strausler syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163:974-979.
9. Goldgaber, D., L. G. Goldfarb, P. Brown, D. M. Asher, W. T. Brown, S. Lin, J. W. Teener, S. M. Feinstone, P. Rubenstein, R. J. Kascsak, et al. 1989. Mutations in familial Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Strausler-Scheinker's syndrome. *Exp. Neurol.* 106:204-206.
10. Hunter, N., J. Hope, I. McConnell, and A. G. Dickinson. 1987. Linkage of the scrapie-associated fibril protein (PrP) and sine using congenic mice and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Gen. Virol.* 68:2711-2716.
11. Kascsak, R. J., R. Rubenstein, P. A. Merz, M. Tonna-DeMasi, R. Fersko, R. I. Carp, H. M. Wisniewski, and H. Düringer. 1987. Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *J. Virol.* 61:3688-3693.
12. Kimberlin, R. H., and C. Walker. 1983. The antiviral compound HPA-23 can prevent scrapie when administered at the time of infection. *Arch. Virol.* 78:9-18.
13. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227:680-685.
14. Pocchiari, M., P. Casaccia, and A. Ladogana. 1989. Amphotericin B: a novel class of antiscrapie drugs. *J. Infect. Dis.* 160:795-802.
15. Pocchiari, M., S. Schmittinger, and C. Masullo. 1987. Amphotericin b delays the incubation period of scrapie in intracerebrally inoculated hamsters. *J. Gen. Virol.* 68:219-223.
16. Prusiner, S. B. 1991. Molecular biology of prion diseases. *Science* 252:1515-1522.
17. Prusiner, S. B., S. P. Cochran, D. F. Groth, D. E. Sowney, K. A. Bowman, and H. M. Martinez. 1981. Measurement of the scrapie agent using an incubation time interval assay. *Ann. Neurol.* 11:353-358.
18. Race, R. E., K. Graham, D. Ernst, B. Caghey, and B. Chesebro. 1990. Analysis of linkage between scrapie incubation period and the prion protein gene in mice. *J. Gen. Virol.* 71:493-497.
19. Xi, Y. G., L. Ingrosso, A. Ladogana, C. Masullo, and M. Pocchiari. 1992. Amphotericin B treatment dissociates in vivo replication of the scrapie agent from PrP accumulation. *Nature (London)* 356:598-601.

5834593